DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00212

哈维氏弧菌铁超氧化物歧化酶基因表达及免疫作用研究

辛瑞晓¹ 易 飞¹ 张 蕊¹ 徐 涛¹ 玄 璞¹ 刘 瑞¹ 贾俊涛² 陈吉祥¹

(1. 中国海洋大学,海洋生物遗传学与基因资源利用教育部重点实验室,青岛 266003;2. 山东出入境检验检疫局,青岛 266002)

摘要:哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是鱼虾等海水动物的重要病原菌。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase) 通过催化超氧阴离子自由基(O_2^-)形成 O_2 和 H_2O_2 ,以保持细胞自由基产生和清除之间的平衡,在病原菌适应 环境及细菌致病性方面发挥重要作用。用 PCR 从哈维氏弧菌基因组扩增得到 600 bp 的目的片段,序列分析 表明与弧菌 Fe-SOD 的序列相似性为 91%—99%。将目的基因片段克隆到原核表达载体进行表达。SDS-PAGE 电泳分析显示纯化的蛋白为单一条带,分子量为 27 kD。具有典型的 Fe-SOD 吸收光谱,对氯仿-乙醇和 H_2O_2 敏感,表明纯化的蛋白属于 Fe-SOD。用邻苯三酚自氧化法测得酶的最适 pH 7,最适温度 20°C。该酶在 pH 6—8 的范围内稳定,当温度超过 40°C时酶的活力迅速丧失。纯化的重组蛋白免疫大菱鲆,4 周后用致病性哈 维氏弧菌进行人工感染试验,对大菱鲆的免疫保护率为 80.00%。Western blot 可以检测到免疫大菱鲆的血清 中的特异抗体。

关键词:哈维氏弧菌;超氧化物歧化酶;基因;表达;性质;免疫原性 中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1000-3207(2012)02-0212-08

微生物在紫外辐射、温度变化、渗透压改变、 氧化等环境应激过程中常常遇到环境中较多超氧阴 离子自由基(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基(OH·) 等的损害,在应激状态下细胞自身代谢产生的自由 基增加^[1],较多的自由基引起细胞毒性作用,如细 胞膜损坏、蛋白质变性、酶失活、DNA 链断裂、染 色体畸变等^[2]。生物在进化过程中形成了有效的抗 自由基防御体系^[3, 4],包括酶和非酶抗氧化系统,酶 抗氧化系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽 过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)等^[5]。超氧 化物歧化酶(Superoxide dismutase,简称 SOD, EC.1.15.1.1)通过催化超氧阴离子形成 O_2 和 H_2O_2 清除 O_2^- ,从而保持 ROS 产生和清除之间的平衡,在 微生物适应环境及细菌致病性方面发挥重要作用^[6]。 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)Fe-SOD 突 变株在有氧环境中生长缓慢,对百草枯的抵抗力降低,绿脓菌素生产能力降低^[7];新生隐球菌(*Crypto-coccus neoformans*)SOD 基因突变株荧光素酶、尿酶和磷脂酶活力明显降低^[8]。

哈维氏弧菌是一种革兰氏阴性海洋细菌,是海水养殖鱼类和对虾的条件性致病菌^[9]。已知哈维氏 弧菌的胞外蛋白酶、磷酯酶、溶血素等与致病性密 切相关, Zhang, *et al.*对不同来源的哈维氏弧菌致病 性及其胞外产物毒性进行研究,发现致病性强的菌 株溶血性和其他胞外产物毒性都很强,部分强致病 性哈维氏弧菌中有两个溶血素编码基因^[10]。哈维氏 弧菌的密度感应系统可以调控细菌的发光、III型分 泌系统、铁载体、多糖的产生,与致病性密切相关^[11]。 但哈维氏弧菌的致病机理尚未完全清楚。本文从哈 维氏弧菌基因组 DNA 克隆 Fe-SOD 基因,构建原核

收稿日期: 2011-01-27; 修订日期: 2011-11-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972275); 国家 863 计划项目(2007AA09Z416); 中国海洋大学"国家大学生创新性实验计划"项目(091042324); 农业部公益性行业专项(nyhyzx 07-046)资助

作者简介: 辛瑞晓(1985—), 女, 青海人; 硕士研究生; 主要从事海洋微生物分子生物学研究。E-mail: xinruixiao@126.com 通讯作者: 陈吉祥、教授; E-mail: betcen@ouc.edu.cn

表达载体,在大肠杆菌诱导表达,研究其理化性质 及免疫作用,以揭示哈维氏弧菌在自然环境中生存 和疾病发生机制,探索该病防治的新途径。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

哈维氏弧菌 SF1 分离自发病的花鲈(Lateolabraxj aponicus),枯草芽孢杆菌 B187 分离自健康的 牙鲆内脏,由本实验室保存,质粒 pMD19-T 购自 TaKaRa公司,大肠杆菌(E. coli)DH5α和BL21(DE3) 购自天根生物公司,质粒 pET26b(+)为本实验室保存。

1.2 试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、dNTP、IPTG、各种限制性 内切酶, DNA 凝胶回收纯化试剂盒由大连宝生物工 程有限公司提供, Ni 琼脂糖亲和层析柱购自 Novagen 公司, NC 膜购自美国 Bio-Rad 公司, 其他 为国产和进口分析纯, 辣根过氧化物酶 HRP 标记羊 抗兔 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司, 兔抗 大菱鲆 IgM 血清为本实验室自备, 标准分子量预染 蛋白质购自天根生物工程有限公司。

PCR 仪(BIO-RAD, Mexico), UV-2100 PC 分光 光度计(Unico), TU-1810 紫外可见分光光度计(北京 普析通用仪器有限责任公司), I-Mupid 电泳仪 (COSMO BIO CO, LTD), 凝胶成像仪(BIO-BEST), MIKRO 22R 离心机(Hittich, Germany), 蛋白电泳仪 (BioRad)。

1.3 哈维氏弧菌 sod 基因克隆及序列分析

根据已发表的哈维氏弧菌全基因序列及其他弧 菌 SOD 基因序列,设计一对特异性引物,上游引物 为 5'-CG<u>GGATCC</u>ATGGAGAATCGAGCAATGG-3', 含 *Bam*H I 酶切位点,下游引物为 5'-CG<u>CTCGAG</u> CTTCGCTAGGTTCTCAGCTAC-3',含 *Xho* I 酶切 位点。

用酚-氯仿法提取哈维氏弧菌基因组 DNA, PCR 反应参数是: 94℃变性 4min, 1个循环; 94℃变性 50s, 55℃退火 50s, 72℃延伸 1min, 35 个循环; 72℃延伸 10min, 1 个循环。PCR 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶 电泳检测, DNA 凝胶回收试剂盒纯化, 回收片段连 接 pMD18-T, 转化大肠杆菌 DH 5 α , 重组质粒命名 为 pMD19-T-SOD, 由上海生物工程公司进行序列测 定, 在 NCBI(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进 行 DNA 序列分析。

1.4 sod 基因表达质粒构建及在大肠杆菌中诱导 表达

原核表达载体 pET-26b(+)和重组质粒 pMD19-T-SOD 分别用 BamH I和 Xho I 进行双酶切,回收 目的基因片段与载体 pET-26b(+)酶切片段,连接后 转化到大肠杆菌 DH 5α,在 LB(含 50 μg/mL 卡那霉 素)平板上培养 16h,随机挑选单菌落于 LB 液体培 养,提取质粒用双酶切和 PCR 验证,阳性克隆质粒 命名为 pET-26b(+)/SOD。最后将表达质粒 pET-26b (+)/SOD 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中,得到重组 菌命名为 BL21(DE3)/pET-26b(+)/SOD。

将重组菌 BL21(DE3)/pET-26b(+)/SOD 接种于 5 mL LB 液体培养基, 37℃ 200 r/min 振荡过夜培养。 次日接入 495 mL LB 培养基,同样条件下培养 3h。 当 A₆₀₀达 0.6 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 25℃继续培养 6h, 4℃ 10000 r/min 离心 10min,分别 收集菌体和上清液,于-20℃保存备用。

1.5 表达 SOD 的 Ni 琼脂糖柱亲和层析纯化

菌体中纯化蛋白 用 20 mL pH 8.0 的缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol/L 咪唑; 0.5 mmol/L NaCl)重悬菌体,加入1000 U/mL的溶菌酶, 30℃孵育 15min。将细胞悬液置于冰浴中用超声波处 理 30min,4℃ 10000 r/min 离心 30min,收集上清液。

培养上清液中纯化蛋白 培养上清液中加入终 浓度为 80%饱和度的硫酸铵, 4℃搅拌过夜。次日于 4℃ 10000 r/min 离心 30min,收集沉淀。沉淀用 50 mL 缓冲液溶解, 4℃ 10000 r/min 离心 10min 除去不溶 物。在缓冲液中 4℃透析 24h,每 4—6h 更换缓冲液 一次。

将 5 mL 金属螯合剂 Ni 琼脂糖装层析柱,用 1×Ni 柱洗涤缓冲液 1(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol/L 咪唑; 0.5 mmol/L NaCl)平衡。将从菌体 和培养上清液得到的粗蛋白样品分别上柱。纯化的 步骤是:依次用 10 倍体积的 1×Ni 柱洗涤缓冲液 1 和 1 倍体积的 1×Ni 柱洗涤缓冲液 2(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol/L 咪唑, 0.5 mmol/L NaCl) 洗涤。最后用 1×Ni 柱洗脱缓冲液 3(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 250 mmol/L 咪唑, 0.5 mmol/L NaCl) 洗脱, 流速 1—2 mL/min, 2 mL/管进行收集。收集蛋 白置于透析袋中用 20 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 透析 液(含 0.85% NaCl, 10%甘油)于 4℃透析 24h。

1.6 表达 SOD 的 SDS-PAGE 检测

取上述诱导表达的 BL21(DE3)/pET-26b(+)/SOD 菌体和纯化的 SOD 蛋白,分别与等体积的 2×上样 缓冲液(100 mmol/L, pH 6.8 Tris-HCl,含 200 mmol/L DDT,4% SDS,0.2% 溴酚兰,20%甘油)混合,100℃ 水浴 3—5min。配制 12%的 SDS-PAGE 分离胶和 5% 的浓缩胶,取 30 μL 样品加于凝胶,进行 SDS-PAGE 电泳,浓缩胶电压 100 V,分离胶电压 200 V,电泳 结束后考马斯亮兰 R250 染色。

1.7 表达 SOD 的酶活性及蛋白质含量测定

酶活性测定采用邻苯三酚自氧化法^[12]。以每分 钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50%时的酶含量定义 为一个酶活力单位(U)。蛋白浓度的测定采用 Bradford法,以牛血清白蛋白作为标准蛋白质^[13]。

1.8 表达 SOD 的吸收光谱测定

取纯化的超氧化物歧化酶液进行紫外和可见光 扫描, 对照为 pH 8.0 的缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L 咪唑, 0.5 mmol/L NaCl), 扫描范围为 200—700 nm。

1.9 表达 SOD 的类型鉴定

超氧化物歧化酶类型鉴定参照文献[14], 在酶 活测定体系中, 加入终浓度为 2.5 mmol/L 的 H₂O₂, 或加不同剂量的氯仿-乙醇溶液(2:3/v:v), 测定酶 的相对活力。根据不同种类 SOD 对 H₂O₂、氯仿-乙 醇的敏感性确定酶的种类。

1.10 pH 对 SOD 酶活力的影响

分别采用 pH 4 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH 5—8 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄缓冲液, pH 9—10 的甘氨 酸-NaOH 缓冲液, pH 11 的 Na₂HPO₄/NaOH 缓冲液。 在相同条件下,用不同 pH 的缓冲液体系反应后测 定酶活力,催化活性最高的 pH 即为酶的最适 pH。 pH 稳定性的测定是将一定量的酶液分别加入到不 同 pH 的缓冲液中保温 1h,将体系调整至酶反应最 适 pH,测定酶活力。在最适反应条件下的酶活力定 义为 100%,用相对酶活力表示在不同 pH 作用下剩 余酶活与最高酶活的比值。

1.11 温度对 SOD 酶活力的影响

将一定量的酶溶液加入到相同反应体系中,分 别在 10℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 温 度梯度下反应,催化活性最高的温度即为酶的最适 温度。温度稳定性的测定:将酶溶液在不同温度下 保温一定时间,然后测定酶的剩余活力。

1.12 重组 SOD 对大菱鲆的免疫保护作用

参照 Zhang, *et al.*^[15]报道的方法进行免疫试验。 健康的大菱鲆随机分为 3 组, 每组 10—22 尾, 实验 组为纯化的重组 SOD, 用免疫佐剂枯草芽孢杆菌 B187 菌悬液(1×10⁷ CFU/mL)稀释至 50 µg/mL, 对照 1 组为枯草芽孢杆菌菌悬液(1×10⁷ CFU/mL), 对照 2 组为生理盐水, 腹腔注射法免疫接种, 注射剂量为 0.1 mL, 沙滤海水充气, 保证每日的换水和投饲。不 同时间段每组取 3 尾大菱鲆, 尾动脉取血, 37℃静置 1h, 移至 4℃冰箱过夜使血清充分析出, 次日 4℃ 10000 r/min 离心 10min, 取上清分装于 1.5 mL 离心 管中, -80℃冰箱保存备用。

免疫4周后用致病性哈维氏弧菌 SF-1 进行人工 感染实验,实验组、对照1组和对照2组分别用0.1 mL 哈维氏弧菌 SF1(3.9×10⁸ CFU/mL)腹腔注射感染,记 录攻毒后两周内各组别每日的发病和死亡情况,根 据公式计算免疫组的免疫保护率,即免疫保护率= (1-试验组死亡率/对照组死亡率)×100%。

1.13 重组 SOD 免疫大菱鲆血清特异性抗体的 Western blot 检测

纯化的 SOD 先经 10% SDS-PAGE 电泳分离, 然 后将蛋白电转移到硝酸纤维素膜上(30 mA, 1h), 5% 的脱脂奶粉溶液 37℃封闭 2h; PBST 洗膜后, 将硝酸 纤维膜浸于(1:100 稀释)抗原免疫的大菱鲆血清 (1:100 稀释)中, 4℃过夜; PBST 洗膜三次后, 加入 二抗(兔抗大菱鲆 IgM 血清 1:1000 稀释), 37℃孵育 2h; PBST 洗膜三次后, 加入 1:200 稀释的辣根过氧 化物酶标记的羊抗兔 IgG, 37℃孵育 2h; 最后按顺序 依次将 DAB 三种试剂各取 3 滴滴于 6 mL 蒸馏水中, 避光混匀,将膜加入显色液中避光显色 5—15min, 双蒸水终止反应, 观察并记录实验结果。

2 结果

2.1 哈维氏弧菌超氧化物歧化酶基因克隆及序列 分析

从哈维氏弧菌基因组通过 PCR 扩增得到 600 bp 的片段,连接克隆载体 pMD19-T,转化宿主菌 DH 5α 测序。用 DNAStar 分析测序得到的 DNA 序列及 其编码氨基酸序列,序列分析表明目的片段含有完 整 sod 基因开放阅读框,编码 199 个氨基酸组成的 蛋白质。BLAST 结果显示与哈维氏弧菌 ATCC BAA-1116(ABU71965.1)、哈维氏弧菌 1DA3(EEZ 87291.1)、 溶藻 胶弧菌 (Vibrio alginolyticus)40B (EEZ83613.1)、副溶血弧菌(Vibrio parahaemolyticus) K5030(EFO51079.1)的 Fe-SOD 的序列相似性高达 98%—99%。与副溶血弧菌 RIMD 2210633 Mn-SOD (BAC60381.1)序列相似性为 99%,与霍乱弧菌(Vibrio cholerae)V52(EAX62672.1)、梅氏弧菌(Vibrio metschnikovii)CIP69.14(EEX36732.1)、拟态弧菌(Vibrio mimicus)VM603(EEW07133.1) 等 Fe-SOD 的序列相 似性分别为 91%—95%。

2.2 超氧化物歧化酶基因原核表达与纯化

将哈维氏弧菌 *sod* 基因连接到原核表达载体 pET-26b(+),阳性质粒命名为 pET-26b(+)/SOD,再 将表达质粒 pET-26b(+)/SOD 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),重组菌命名为 BL21(DE3)/pET-26b(+)/SOD。 用 1 mmol/L IPTG 在 25℃诱导表达,通过 Ni 亲和层 析分离纯化, SDS-PAGE 分析表明在 27 kD 处有特异 性条带(图 1),与理论值一致。在培养上清液中未检 测到该条带。

2.3 超氧化物歧化酶类型鉴定

纯化的超氧化物歧化酶在紫外区最大吸收波长为 280 nm, 在可见光区最大吸收波长为 362 nm, 具有典型的 Fe-SOD 特征。

超氧化物歧化酶对氯仿-乙醇敏感,在测定体系中加入氯仿-乙醇后,立即出现白色混浊现象,酶与抑制剂 2:1 体积充分混匀作用 20min 后,只有 7%的活力,而加入 2 倍体积的抑制剂后,酶彻底失活。测定体系中分别加入终浓度为 2.5 mmol/L 的 H₂O₂, 30min 后抑制酶的活力剩余为 75%, 2h 后,酶活力剩

余为 14%, 表明 SOD 对 H_2O_2 敏感, 根据对 2 种抑 制剂的敏感程度进一步判断为 Fe-SOD。



图 1 SDS-PAGE 分析纯化的哈维氏弧菌 Fe-SOD

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant Fe-SOD of *Vibrio harveyi*

M.标准分子量蛋白质; 1.纯化的 SOD 蛋白 M. Protein Marker; 1. Purified SOD

2.4 温度对 SOD 酶活性的影响

不同温度下的酶活力和稳定性(图 3), 酶的最适 温度为 20℃(图 2A)。在 10—30℃的温度范围内, 酶 活力稳定, 在 60℃时处理 10min, 相对酶活性急剧 下降至 20%, 1h 后酶活力剩余为 3%, 70℃作用 20min 酶彻底失去活性(图 2B)。

2.5 pH 对 SOD 酶活性的影响

pH 对 SOD 酶活性和稳定性的影响(图 3), 酶的 最适 pH 为 7, 酶在 pH 6—8 时比较稳定, pH 9 和 pH 10 处理 1h 相对酶活力分别为 27%和 3%, pH 11 时活 性完全丧失。



图 2 超氧化物歧化酶的最适温度 A 和温度对酶稳定性的影响 B

Fig. 2 The optimal temperature A and effect of temperature on stabilities of the recombinant SOD B



图 3 超氧化物歧化酶的最适 pH A 和 pH 稳定性 B Fig. 3 The optimal pH A and effect of pH on stabilities of the recombinant SOD B

2.6 H₂O₂ 对 SOD 酶活性的影响

纯化的酶溶液加入终浓度为 2.5 mmol/L 的
H₂O₂,作用 30min 后酶的活力剩余为 75%, 2h 后仅
保留 14%的酶活力,表明 SOD 对 H₂O₂ 敏感(图 4)。





2.7 SOD 对大菱鲆免疫保护作用及抗原性测定

用纯化的重组 SOD 免疫大菱鲆,4 周后用哈维 氏弧菌进行人工感染,在感染后两周内,对照组大 菱鲆全部死亡,并且出现了明显症状,如运动和摄 食能力下降,腹水,体表溃疡等;而注射纯化蛋白 实验组仅有 2 尾死亡,其他健康状况均良好,免疫 保护率达到 80.00% (表 1)。

2.8 免疫大菱鲆血清特异性抗体的Western blot 检测

纯化的哈维氏弧菌 SOD 进行 SDS-PAGE 电泳 后转印,以 SOD 免疫后的大菱鲆血清作为一抗,兔 抗大菱鲆血清作为二抗,纯化蛋白与免疫后第 3 周 的大菱鲆血清(1:100 稀释)发生反应,在目的蛋白 对应位置出现一条特异性免疫反应条带(图 5),说明 重组蛋白作为抗原免疫大菱鲆,刺激大菱鲆血清中 产生了特异性抗体,而对照组没有特异性反应条带。

3 讨论

生物细胞的 SOD 主要有 CuZn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD 三种。CuZn-SOD 存在于真核生物和一些 革兰氏阴性细菌如大肠杆菌、嗜血杆菌(Haemophilus

| Tab. 1The immunoprotective effect of the recombinant SOD on turbot | | | | |
|--|--------|--------------|---------------|---------|
| 组别 | 免疫尾数 | 死亡尾数 | 死亡率 | 免疫保护率 |
| Group | Sample | No. of death | Mortality (%) | RPS (%) |
| 生理盐水对照组 Control | 22 | 22 | 100 | 0 |
| 枯草芽孢杆菌对照 Control | 20 | 20 | 100 | 0 |
| 免疫组哈维氏弧菌攻毒 Immunized with SOD | 10 | 2 | 20.00 | 80.00 |

表 1 重组 SOD 对大菱鲆的免疫保护效果



图 5 重组蛋白的免疫印迹分析

Fig. 5 Western blot analysis of the purified SOD protein
1. 阴性血清对照; 2. 纯化的 SOD 蛋白; M. 标准分子量预染蛋白质

1. Negative serum control; 2. Purified SOD protein; M. Prestained Protein Marker

species)、肺炎军团菌(Legionella pneumophila)等的 周质间隙, Mn-SOD 存在于原核细胞质及真核生物 线粒体中, Fe-SOD 存在于原核生物细胞质及真核生 物叶绿体中。大肠杆菌含有三种 SOD, 多数真细菌 和古菌中只有 Mn-SOD 和 Fe-SOD^[4, 16, 17]。目前已发 现弧菌细胞有 Mn-SOD、Fe-SOD 和 CuZn-SOD^[18]。 本文从哈维氏弧菌 SF1基因组获得的 sod 序列为 600 bp, 编码 199 个氨基酸的蛋白质, 其氨基酸序列除 了与一株副溶血弧菌 Mn-SOD 相似性较高外, 与大 部分弧菌中的 Fe-SOD 相似性均较高。

在 E.coli 中表达的重组蛋白经常以聚集的形式 (包涵体)表达,这样纯化得到的包涵体蛋白往往没 有活性,我们选择带有 pelB 信号肽的载体 pET-26, 让蛋白运输到更有利于蛋白折叠及二硫键形成的细 胞周质中^[19]。同时, 表达的融合蛋白的 N 末端有 6 个组氨酸的多肽标签、有利于通过镍螯合柱进行目 的蛋白纯化。通过表达优化,我们在大肠杆菌中高 效表达了 SOD 蛋白、分子量为 27 kD、酶的最适温 度为 20℃, 最适 pH 为 7, 是一种对热敏感的低温 酶,在 10—30℃的温度范围内酶活力稳定,温度超 过 40℃时酶的活力明显丧失, 60℃处理 1h 后酶活 力剩余为 3%。酶在 pH 6-8 时稳定。纯化的蛋白 最大吸收峰位于 280 nm 和 362 nm, 与 Yost, et al.报 道的在大肠杆菌中分离的 Fe-SOD 的特征吸收光谱 一致^[20]。对氯仿-乙醇和 H₂O₂ 敏感、进一步表明属 于 Fe-SOD。

已有许多研究证明 SOD 与部分病原菌的致病性

有直接关系, 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae) 和小结肠炎耶尔森氏菌(Yersinia. Enterocolitica) *Mn-sod* 基因突变株对鼠的致病力明显降低^[21, 22]。 Kang, et al.发现创伤弧菌*Mn-sod*突变株的*LD*₅₀与野 生型相比增加了 110 倍, 表明 SOD 在创伤弧菌致病 过程中发挥重要作用, 此外还发现 Mn-SOD 在缺铁 环境和酸性环境诱导表达, Fe-SOD 在细胞生长阶段 持续表达, Mn-SOD 突变株对酸性环境的耐受性比 Fe-SOD 更为敏感^[23]。Banin, et al.发现施罗氏弧菌 (*V.shiloii*) sod 基因突变株的致病力明显减弱, 表明 SOD 为一个重要的毒力因子^[24]。

鱼类弧菌病的防治目前主要靠抗菌素和化学药 物、疫苗防治因安全无污染而有巨大的应用潜力。 哈维氏弧菌的外膜蛋白、溶血素、胞外蛋白酶等毒 力因子可以作为高效的保护性抗原^[25-27], Li, et al. 发现哈维氏弧菌的外膜蛋白 OmpK 能有效保护斜 带石斑鱼(Epinephelus coioides)对哈维氏弧菌、溶藻 胶弧菌及副溶血弧菌的感染^[28]。Sun, et al.用外膜蛋 白免疫牙鲆、用哈维氏弧菌攻毒后被免疫鱼的死亡 率为10%,而生理盐水对照组的死亡率为93.3%^[29]。 Zhang, et al.用纯化的重组丝氨酸蛋白酶 Vhp1 免疫 牙鲆(Paralichthys olivaceus), 发现其对牙鲆的免疫 保护率为 70% ^[15]。本文用纯化的重组 SOD 对大菱 鲆进行免疫注射,4周后用哈维氏弧菌攻毒,免疫保 护率达到 80.00%。这表明纯化的重组蛋白对由哈维 氏弧菌的感染起了较好保护作用。Beaman, et al.研 究表明星形诺卡菌 SOD 抗血清抑制细菌 SOD 的活 性、增强小鼠腹腔吞噬细胞对星形诺卡菌的吞噬作 用^[30]。有学者发现结核分支杆菌的 SOD 作为一种 T 细胞诱导抗原,可作为抗结核的候选疫苗^[31]。免疫 印迹实验发现,免疫的大菱鲆血清能够较好地识别 并与原核表达纯化的重组蛋白发生反应、进一步证 明了纯化 SOD 具有较好的免疫原性。这表明 SOD 也可作为鱼类弧菌病的有效抗原、用于该病的免疫 防治。

参考文献:

- Imlay J A, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity
 [J]. Science, 1988, 240(4857): 1302–1309
- [2] Imlay J A. Pathways of oxidative damage [J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 395–418
- [3] Yu B P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species [J]. *Physiological Reviews*, 1994, 74(1): 139—

162

- [4] Herrero E, Ros J, Belli G, *et al.* Redox control and oxidative stress in yeast cells [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1780(11): 1217–1235
- [5] Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(14): 7761—7764
- [6] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases[J]. Annual Review of Biochemistry, 1995, 64: 97–112
- [7] Iiyama K, Chieda Y, Lee J M, et al. Effect of superoxide dismutase gene inactivation on virulence of *Pseudomonas* aeruginosa PAO1 toward the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(5): 1569– 1575
- [8] Narasipura S D, Ault J G, Behr M J, et al. Characterization of Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1)gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans var. gattii*: role in biology and virulence [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 47(6): 1681–1694
- [9] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish [M]. 3rd edn (revised). Springer-Praxis, Godalming. 1999
- [10] Zhang X H, Meaden P G, Austin B. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3161–3167
- [11] Lowery C A, McKenzie K M, Qi L W, et al. Quorum sensing in Vibrio harveyi: probing the specificity of the LuxP binding site [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2005, 15(9): 2395–2398
- [12] Deng B Y, Yuan Q S, Li W J. Improved method for determination of SOD activity by using pyrogallol [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1991, **18**(2): 163—165 [邓碧玉,袁勤生,李文杰.改良的连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶的活性.生物化学与生物物理进展,1991,**18**(2): 163—165]
- [13] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein clye bineling [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248–254
- [14] Zou G L, Luo S W, Qiu M Y, et al. Purification and some properties of Copper/Zinc Superoxide Dismutase in Chinese cabbage chloroplasts [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1992, 24(2): 180—183 [邹国林,罗时文, 裘名宜,等.小白菜线粒体锰超氧化物歧化酶的纯化和性质研究. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(2): 180—183]
- [15] Zhang W W, Sun K, Cheng S, et al. Characterization of DegQ_{vh}, a serine protease and a protective immunogen from a pathogenic Vibrio harveyi strain [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(20): 6254–6262
- [16] Bannister J V, Bannister W H, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase
 [J]. CRC Critical Reviews in Biochemistry, 1987, 22(2): 111—

180

- [17] Fink R C, Scandalios J G. Molecular evolution and structure function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms, and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002, 399(1): 19—36
- [18] Gabbianelli R, D'Orazio M, Pacello F, et al. Distinctive functional features in prokaryotic and eukaryotic Cu, Zn superoxide dismutases [J]. *Biological Chemistry*, 2004, 385(8): 749—754
- [19] Raina S, Missiakas D. Making and breaking of disulfide bonds [J]. Annual Review of Microbiology, 1997, 51: 179– 202
- [20] Yost F, Fridovich I. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1973, 248(14): 4905–4908
- [21] Yesilkaya H, Kadioglu A, Gingles N, et al. Role of manganese-containing superoxide dismutase in oxidative stress and virulence of *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(5): 2819–2826
- [22] Roggenkamp A, Bittner T, Leitritz L, et al. Contribution of the Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of Yersinia enterocolitica Serotype O8 [J]. Infection and Immunity, 1997, 65(11): 4705–4710
- [23] Kang I H, Kim J S, Lee J K. The virulence of Vibrio vulnificus is affected by the cellular level of superoxide dismutase activity [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(8): 1399–1402
- [24] Banin E, Vassilakos D, Orr E, et al. Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen Vibrio shiloi [J]. Current Microbiology, 2003, 46(6): 0418-0422
- [25] Ningqiu L, Junjie B, Shuqin W, 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(6): 829–833
- [26] Pan X Y, Shen J Y, Yu X P, et al. Cloning, expression, immunogenicity of extracellular proteinase from Vibrio Harveyi [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 153—156
 [潘晓艺,沈锦玉,余旭平,等.哈维氏弧菌胞外蛋白酶基因的克隆表达及免疫原性.水生生物学报, 2010, 34(1): 153—156]
- [27] Zhu K, Chi Z, Li J, *et al.* The surface display of haemolysin from *Vibrio harveyi* on yeast cells and their potential applications as live vaccine in marine fish [J]. *Vaccine*, 2006, 24(35-36): 6046–6052
- [28] Li N, Yang Z, Bai J, et al. A shared antigen among Vibrio species: outer membrane protein-OmpK as a versatile Vibriosis vaccine candidate in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2010, 28(5-6): 952–956
- [29] Sun K, Zhang W, Hou J, et al. Immunoprotective analysis of

VhhP2, a Vibrio harveyi vaccine candidate [J]. Vaccine, 2009, 27(21): 2733-2740

[30] Beaman L, Beaman B L. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asterides* within the intact host [J]. *Infection and Im*- munity, 1990, 58(9): 3122-3128

[31] Bisht D, Mehrotra J, Dhindsa M S, et al. A major T-cell-inducing cytosolic 23 kDa protein antigen of the vaccine candidate *Mycobacterium habana* is superoxide dismutase [J]. *Microbiology*, 1999, **142**(6): 1375–1383

EXPRESSION AND IMMUNOPROTECTIVE ANALYSIS OF IRON-COFACTORED SUPEROXIDE DISMUTASE FROM VIBRIO HARVEYI

XIN Rui-Xiao¹, YI Fei¹, ZHANG Rui¹, XU Tao¹, XUAN Pu¹, LIU Rui¹, JIA Jun-Tao² and CHEN Ji-Xiang¹

(1. Department of Marine Biology, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
 2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract: *Vibrio harveyi* is one of the important bacterial pathogens of marine animals. Superoxide dismutases, which abate and clear the effect of O_2^- via catalyse dismutation of superoxide into hydrogen peroxide and oxygen, belong to the anti-oxidation defense system and play a central role in protection against oxidative stress. An iron-cofactored superoxide dismutase gene was cloned by PCR amplification from the chromosomal DNA of *V. harveyi* SF1. The ORF of the *sod* gene consists of 600 bp, Sequence analysis showed that homologies of the amino acid sequence with those of Fe-SOD ranged from 91% to 99%. The *sod* gene was subcloned into pET26b (+) for experssion. SDS-PAGE confirmed that the purified protein was 27 kD. The purified SOD belonged to Fe-SOD based on the analysis of sensitivity to hydrogen peroxid, chlorofrom-ethanol and ultraviolet-visible spectroscopy. Pyorgallol autoxidation method was used to determine SOD activity of the purified protein. The purified SOD had the maximal activity at pH 7 and was stable over a range of pH 6—8. The optimal temperature for enzyme activity was 20°C. The protein was stable under 40°C. Turbots (*Scophthalmus maximus*) were immunized with 50 ug of the purified SOD. The immunized fish were then challenged with 0.1 mL of *V. harveyi* (3.9×10^8 CFU/mL) four weeks later. The relative percentage survivals (RPS) of the immunized group were 80.00%. Specific antibody could be detected in the sera of the immunized fish with Western blot analysis.

Key words: Vibrio harveyi; Superoxide dismutase; Expression; Purification; Characterization; Immunogenicity