

副溶血弧菌免疫原性蛋白的鉴定及克隆表达

田丽花, 叶智鸽, 温良优, 潘建义, 赵辅昆

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘要: 运用蛋白质组学及免疫学技术筛选和鉴定副溶血弧菌的外膜蛋白中具有较好免疫原性的外膜蛋白, 为防治副溶血弧菌类疾病的亚单位疫苗的研发奠定基础。用灭活的副溶血弧菌免疫 ICR 小鼠制备抗血清; 通过对外膜蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析筛选免疫原性蛋白, 经 MALDI-TOF/TOF-MS 质谱分析, 对免疫原性蛋白进行鉴定。克隆表达免疫原性蛋白 VP0802, 并对该蛋白的表达条件进行优化, 最后纯化蛋白 VP0802, 并免疫小鼠获得抗血清, 通过 Western Blot 验证蛋白 VP0802 的免疫原性。结果: 免疫小鼠所得到的抗血清效价为 1:5 000; 经免疫印迹分析确定了 12 种外膜蛋白具有较好免疫原性, 其中 10 种外膜蛋白经质谱分析得到鉴定, 分别为 LPS-assembly protein, VP0802, Maltoporin, Chitoporin, OmpC, OmpA, OmpU, OmpK, VP1243 和 VP0966。成功构建免疫原性蛋白 VP0802 的高表达菌株; 该菌株在低温低转速的条件下诱导, 目的蛋白仍以包涵体形式存在, 在 37℃, 220 r/min, IPTG 浓度为 1 mmol/L 的条件下诱导, 目的蛋白表达量较高, 纯化得到蛋白 VP0802 并验证了该蛋白的免疫原性。表明在副溶血弧菌的外膜蛋白中存在多种与免疫原性相关的蛋白, 且部分蛋白为首次发现具有免疫原性。

关键词: 副溶血弧菌; 外膜蛋白; 免疫原性; VP0802

中图分类号: Q511

文献标志码: A

0 引言

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是海洋环境中最常见的细菌类群之一, 属于革兰氏阴性嗜盐性弧菌^[1]。该菌是海水养殖动物的重要病原菌之一, 给养殖业带来严重的经济损失^[2], 同时也是一种食源性致病菌^[3], 易引起食物中毒, 尤其在沿海地区发病率较高^[4]。此外, 副溶血弧菌还可能引发伤口感染, 甚至可导致败血症或死亡, 其对人类的危害已引起全世界的关注。以往对副溶血弧菌的预防和治疗主要使用抗生素, 众所周知, 抗生素的大量使用易导致机体产生抗药性, 造成水污染、环境恶化及影响生态平衡等问题^[5-6]。而采用免疫保护的方法来预防和治疗副溶血弧菌感染不仅对人和动物无毒副作用、无药物残留, 并且对疾病有良好的防治效果^[7-9]。

近年来, 已有大量研究表明革兰氏阴性菌外膜蛋白具有免疫原性^[10-13], 因此, 较为系统的研究副溶血弧菌外膜蛋白的免疫原性, 筛选具有强保护性的抗原, 可为亚单位疫苗的研制开发提供积极的参考^[14]。本文以副溶血弧菌为研究主体, 运用蛋白质组学技术筛选及鉴定具有免疫原性的外膜蛋白, 通过原核表达系统表达关键免疫原性蛋白, 可为筛选候选疫苗靶位奠定理论基础, 对海水养殖鱼类疾病的防治具有重要理论意义和应用价值, 同时为筛选具有较高免疫保护作用的疫苗候选靶位和控制弧菌感染提供免疫学基础。

1 实验材料和方法

1.1 材料

E. coli DH5 α 菌种、*E. coli* BL21 菌种、副溶血

收稿日期: 2013-03-01

基金项目: 国家自然科学基金(31200110); 浙江省自然科学基金(Y2010396)

作者简介: 田丽花(1988-), 女, 山东滨州人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学及微生物蛋白质组学研究。

通信作者: 潘建义, Email: panjy@zstu.edu

弧菌菌株 RIMD2210633, 原核表达载体 pET-28a (+) 均由本实验室保存; ICR 小鼠购自杭州师范大学, SCXK(浙) 2011-0048; PVDF 膜购自 Millipore 公司; *Taq* 酶及相应 PCR 反应有关试剂购自上海莱枫生物科技有限公司; 各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶及其相关试剂购自宝生物工程(大连)有限公司; 胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司; 蛋白胨、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司; 十二烷基肌氨酸钠、IPTG、Kan、Amp 购自华东医药股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 抗血清制备

将副溶血弧菌培养至 OD₆₀₀ 约为 0.8, 稀释至密度约为 1×10^7 cfu/mL^[15], 离心后加入等体积 0.3% 的福尔马林, 4℃ 灭活 24 h^[14], 涂板验证菌体无活性后, 6 000 r/min 离心 10 min, 洗涤去除福尔马林, 用等体积 PBS 重悬, 重悬液作为抗原免疫小鼠, 300 μL/只, 共免疫 3 只小鼠, 隔周加强免疫 1 次, 加强免疫共 5 次, 第五次免疫 5 d 后断尾取血, Dot-ELISA 法测定效价。然后内眦取血, 制备血清, 小管分装, -20℃ 保存。

1.2.2 外膜蛋白提取

外膜蛋白的提取采用改进的 Sarkosyl 法^[16-17], 操作如下: 副溶血弧菌培养至对数期, 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。菌体超声破碎后, 4℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min, 将上清液于 4℃, 100 000 r/min 超速离心 1 h, 所得沉淀即为膜蛋白。膜蛋白用缓冲液(质量分数为 2% 的十二烷基肌氨酸钠, 终浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl, pH 7.5)重悬, 室温放置 40 min, 再次超速离心(条件同上), 所得沉淀即为外膜蛋白。外膜蛋白用缓冲液(终浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl, 150 mmol/L 的 NaCl, 体积比为 10% 的甘油、0.8% 的 triton X-100)溶解, 小管分装, -80℃ 保存。

1.2.3 免疫原性蛋白的筛选及确定

将提取的外膜蛋白进行 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析, 显示特异性条带的蛋白即为免疫原性蛋白。从凝胶上切取免疫原性蛋白条带, 参照 Shevchenko 等^[18] 的方法经胶内酶解处理后, 进行 MALDI-TOF MS/MS 质谱分析, 并经 MASCOT 2.0 搜索蛋白质数据库, 以确定蛋白质种类。

1.2.4 重组质粒 pET-28a(+)-VP0802 构建

根据 NCBI 中获取 VP0802 基因序列信息, 辅助引物设计软件 Primer5.0 设计正向引物 P1 和反

向引物 P2, 引物序列见表 1。

表 1 VP0802 的 PCR 扩增引物

引物	序列(5'→3')	限制性酶切位点
P1(F)	GGAATTCCATATGATGGACAAA TTTTTTAAGGT	<i>Nde</i> I
P2(R)	CCGCTCGAGTTAGTGGAAGCTG- TAAGG	<i>Xho</i> I

注: 下划线标示出限制性酶切位点。

以副溶血弧菌的基因组 DNA 为模板, P1/P2 为引物进行 PCR 扩增: 94℃、3 min; 94℃、30 s, 55℃、30 s, 72℃、90 s, 共 30 个循环; 72℃、10 min。PCR 产物和载体 pET-28a(+)-VP0802 分别用 *Nde*I、*Xho*I 限制性酶进行双酶切, 酶切产物用 T4 DNA 连接酶连接后转化 DH5α 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 并进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定。

1.2.5 蛋白 VP0802 的诱导表达

将重组质粒 pET-28a(+)-VP0802 转化 BL21 感受态细胞, 挑单克隆振荡培养过夜, 转接培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4~0.6, 在 37℃, 220 r/min, IPTG 终浓度为 1 mmol/L 的条件下诱导表达, 诱导 4 h 后取样, 通过 SDS-PAGE 和 MALDI-TOF/TOF-MS 加以鉴定。

1.2.6 蛋白 VP0802 表达条件优化

以 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L 的 IPTG 分别在 37℃ 和 20℃ 条件下诱导表达蛋白 VP0802, 37℃ 条件下 220 r/min 诱导 4 h, 20℃ 条件下 100 r/min 诱导 20 h。诱导后分别取样进行 SDS-PAGE 分析, 确定蛋白 VP0802 表达的最佳诱导剂浓度和温度。

1.2.7 蛋白 VP0802 的纯化

收集诱导后的菌体并用 PBS 洗涤 3 次, 超声破碎, 在 4℃, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。在室温下, 按质量体积比 1/40 的比例依次用洗涤液 I (终浓度为 10.0 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 8.0)、1.0 mmol/L 的 EDTA)、洗涤液 II (终浓度为 10.0 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 8.0)、1.0 mmol/L 的 EDTA, 体积比为 1% 的 Triton X-100)、洗涤液 III (终浓度为 10.0 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 8.0)、1.0 mmol/L 的 EDTA, 2 mol/L 的尿素) 洗涤沉淀 2 h, 4℃ 离心取沉淀, 得到目的蛋白 VP0802。

1.2.8 蛋白 VP0802 的免疫原性验证

利用纯化的蛋白 VP0802 免疫小鼠, 获得抗

血清,通过 Dot-ELISA 法检测抗血清效价,并通过 Western Blot 实验验证蛋白 VP0802 的免疫原性。

2 结果与分析

2.1 抗血清制备

以灭活的副溶血弧菌作为抗原免疫小鼠 5 次,采用断尾取血法获取血液,获得血清并分装,将血清分别稀释 100、500、1 000、2 000、5 000 倍后,经 Dot-ELISA 法检测抗血清效价,约为 1 : 5 000,结果如图 1 所示。

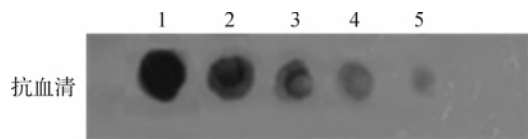


图 1 Dot-ELISA 分析抗血清效价

1. 1 : 100; 2. 1 : 500; 3. 1 : 1 000; 4. 1 : 2 000; 5. 1 : 5 000

2.2 免疫原性蛋白筛选

采用十二烷基肌氨酸钠抽提法并结合超速离心提取副溶血弧菌的外膜蛋白,分别进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析,筛选出免疫原性蛋白,确定位置并标上编号,如图 2 所示。

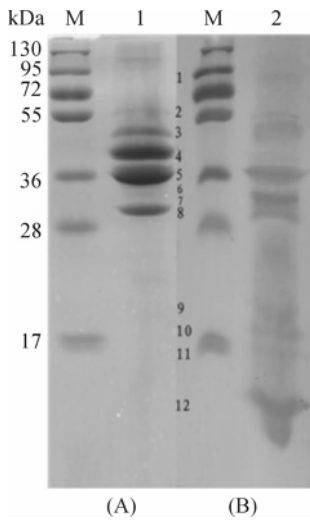


图 2 VP 外膜蛋白的 SDS-PAGE(A)和 Western Blot 分析(B)

M. 预染 Marker; A. SDS-PAGE, 1. 蛋白 VP0802; B. Western Blot, 2. 蛋白 VP0802

2.3 免疫原性蛋白确定

切取对应的免疫原性蛋白条带,经过胶内酶解,质谱分析,确定免疫蛋白分别为 LPS-assembly protein, VP0802, Maltoporin, Chitoporin, OmpC, OmpA, OmpU, OmpK, VP1243 和 VP0966。其中标号为 11 和 12 的蛋白检测分数较低,可靠性低,未列入表中,详见表 2。

表 2 免疫原性蛋白质谱鉴定结果

编号	蛋白名称	登录编号	基因名称	分子量	检测分数
1	LPS-assembly protein	gi 28897113	<i>lptD</i>	89 414	99
2	hypothetical protein VP0802	gi 28897576	<i>VP0802</i>	51 861	93
3	maltoporin precursor	gi 228551838	<i>lamB</i>	46 350	2 151
4	chitoporin	gi 28897534		40 764	318
	outer membrane protein C precursor	gi 328470007	<i>ompC</i>	36 003	1 874
5	outer membrane protein OmpA	gi 28901041	<i>ompA</i>	36 105	252
6	outer membrane protein OmpU	gi 28899241	<i>ompU</i>	36 263	158
7	outer membrane protein OmpA	gi 28900103	<i>ompA</i>	35 645	133
8	outer membrane protein OmpK	gi 1709464	<i>ompK</i>	29 448	855
9	hypothetical protein VP1243	gi 28898017	<i>VP1243</i>	19 769	119
10	hypothetical protein VP0966	gi 28897740	<i>VP0966</i>	14 723	63

2.4 重组质粒 pET-28a(+)-VP0802 的构建

提取重组质粒 pET-28a(+)-VP0802 以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 鉴定,并用 *Nde*I/*Xho*I 进行双酶切鉴定,1%琼脂糖凝胶电泳检测,电泳在 1 410 bp 处有明显条带,与预期的目的条带大小相符,在 3 000 bp 偏小处有一条明显的条带,与预期的载体大小相符,说明重组质粒 pET-28a(+)-VP0802 构建成功。

2.5 蛋白 VP0802 的表达

将重组质粒 pET-28a(+)-VP0802 转化 BL21 感受态细胞中,挑单克隆摇菌过夜,转接培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4~0.6,用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 37℃,220 r/min 诱导 4 h 后取样,进行 SDS-PAGE 实验,发现在 51 kDa 处蛋白量明显增加(如图 3 箭头所示)。将该蛋白条带进行质谱分析,表明该蛋白为 VP0802,质谱结果如表 3 所示。

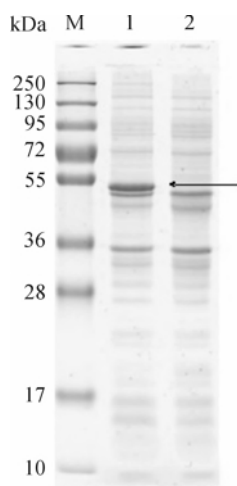


图3 BL21菌株诱导前后全菌蛋白 SDS-PAGE

M. 预染 Marker; 1. BL21 诱导后全菌蛋白;
2. BL21 诱导前全菌蛋白

表3 蛋白 VP0802 的质谱鉴定

蛋白名称	登录编号	基因名称	分子量	检测分数
hypothetical protein VP0802	gi 28897576	VP0802	51861	188

2.6 蛋白 VP0802 表达条件优化

以 0.1、0.5、1 mmol/L 的 IPTG 分别在 37℃ 和 20℃ 条件下诱导目的蛋白表达, 37℃ 条件下 220 r/min 诱导 4 h, 20℃ 条件下 100 r/min 诱导 20 h。诱导后分别取样进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 4 所示, 20℃ 条件下 0.5 mmol/L IPTG 诱导的蛋白表达量相对较高, 37℃ 条件下 1 mmol/L IPTG 诱导的蛋白表达量相对较高。将 20℃, 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达的重组菌超声离心后, 上清与沉淀分别进行 SDS-PAGE, 鉴定目的蛋白的存在形式, 如图 5 所示, 上清中未显示目的蛋白, 而沉淀中在 51 kDa 处有明显条带, 证明低温低转速诱导下, 该蛋白亦以

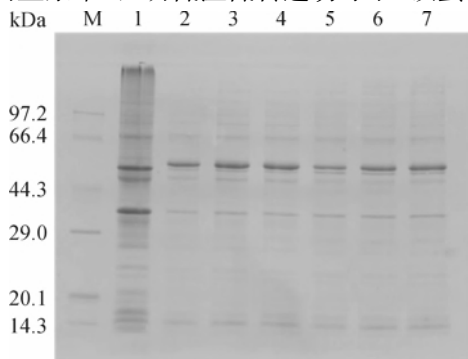


图4 蛋白 VP0802 表达条件优化

M. 低分子量蛋白 Marker; 1. 诱导前; 2. 20℃, IPTG 0.1 mmol/L; 3. 20℃, IPTG 0.5 mmol/L; 4. 20℃, IPTG 1.0 mmol/L; 5. 37℃, IPTG 0.1 mmol/L; 6. 37℃, IPTG 0.5 mmol/L; 7. 37℃, IPTG 1.0 mmol/L

包涵体形式存在。

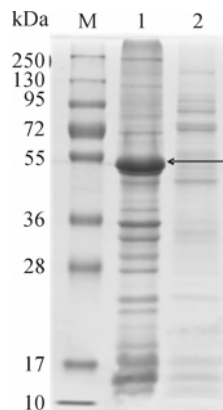


图5 超声后上清及沉淀的 SDS-PAGE

M. 蛋白 Marker; 1. 超声后沉淀; 2. 超声后上清

37℃ 条件下, 经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导的重组菌, 超声所得沉淀经洗涤液 I、II、III 依次洗涤后, 所得沉淀用 PBS 重选后, 取少量重悬液制样进行 SDS-PAGE, 分析目的蛋白 VP0802 的纯化效果, 结果如图 6 所示。

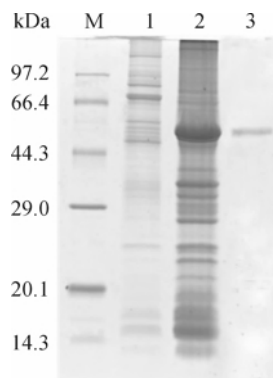


图6 纯化后蛋白 VP0802 的 SDS-PAGE

M. 蛋白 Marker; 1. 超声后上清;
2. 超声后沉淀; 3. 纯化的蛋白 VP0802

2.7 验证蛋白 VP0802 的免疫原性

用纯化的蛋白 VP0802 免疫小鼠, 采用断尾取血方法获得适量的血液, 处理得到血清, 经 Dot-ELISA 法检测抗血清及正常血清对外膜蛋白 VP0802 的效价, 将血清分别稀释 100 倍, 500 倍, 1 000 倍, 2 000 倍和 5 000 倍进行实验, 结果发现实验组血清稀释 5 000 倍时仍发生阳性反应, 而正常血清稀释 2 000 倍时既无阳性反应, 结果如图 7 所示。通过 Western Blot 验证蛋白 VP0802 的免疫原性, 结果如图 8 所示。

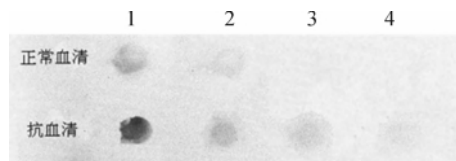


图7 蛋白 VP0802 免疫后血清 Dot-ELISA 效价测定

1. 1:500; 2. 1:1000; 3. 1:2000; 4. 1:5000

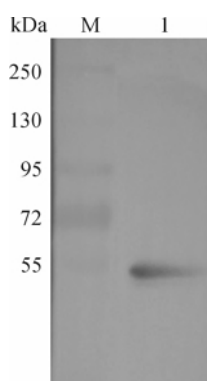


图 8 蛋白 VP0802 免疫印迹实验
M. 蛋白预染 Marker; 1. 蛋白 VP0802

3 结 论

本研究选用副溶血弧菌为研究对象,制备得到效价达 1 : 5 000 的抗血清,副溶血弧菌外膜蛋白经 SDS-PAGE 及 Western Blot 实验发现有多条蛋白条带发生阳性反应,证明有多种蛋白与免疫原性相关,经 MALDI-TOF/TOF-MS 分析,确定了免疫原性蛋白种类,分别为 LPS-assembly protein, VP0802, Maltoporin, Chitoporin, OmpC, OmpA, OmpU, OmpK, VP1243 和 VP0966。其中 OmpU 和 OmpK 已经被证实与免疫原性相关^[19-20],而 LPS-assembly protein LptD, VP0802, VP2850, VP1243 和 VP0966 为首次发现为免疫原性蛋白。免疫原性外膜蛋白的确定为筛选高免疫保护性的疫苗候选靶位和控制弧菌感染提供免疫学基础,为亚单位疫苗的进一步开发和研制提供参考。

本研究选择免疫原性蛋白 VP0802 深入研究,构建重组质粒 pET-28a(+)-VP0802,并成功诱导表达纯化蛋白 VP0802。实验表明 20℃, 100 r/min, 0.5 mmol/L IPTG 诱导和 30℃, 220 r/min, 1 mmol/L IPTG 诱导的蛋白表达量较高,但低温低转速诱导并不能抑制该蛋白以包涵体形式表达。纯化得到蛋白 VP0802,并证明该蛋白有免疫原性。这为副溶血弧菌免疫原性蛋白的保护性分析提供研究基础。

参考文献:

[1] Koga T, Kawata T. Isolation and characterization of the outer membrane from vibrio parahaemolyticus[J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129 (10): 3185-3196.
[2] Zhang Y, Wang S, Peng X. Identification of a type of human igg-like protein in shrimp penaeus vannamei by

mass spectrometry[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 301(1): 39-54.
[3] Boehme J, Frischer M, Jiang S, et al. Viruses, bacterioplankton, and phytoplankton in the southeastern gulf of mexico: Distribution and contribution to oceanic DNA pools[J]. Marine Ecology-Progress Series, 1993, 97 (1): 1-3.
[4] Mao Zhijuan, Yu Lian, You Zhenqiang, et al. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of Vibrio parahaemolyticus zj2003 [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(3): 567-575.
[5] 战文斌, 齐继光, 刘洪明, 等. 水产动物 6 种主要病原菌与抗血清的免疫交叉反应[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 14-19.
[6] Adams A, Thompson K D. Biotechnology offers revolution to fish health management[J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(5): 201-205.
[7] Kim Y K, McCarter L L. Analysis of the polar flagellar gene system of vibrio parahaemolyticus[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(13): 3693-3704.
[8] Shinoda S, Senoh T, Asano K, et al. Differences between surface antigenic determinants of polar monotrichous flagella of vibrio parahaemolyticus and of related species[J]. Microbiology and Immunology, 1980, 24 (5): 409-415.
[9] 池信才, 王 军, 鄢庆彬, 等. 大黄鱼病原副溶血弧菌单克隆抗体制备及其应用[J]. 海洋科学, 2007, 31(8): 1-5.
[10] 赵香汝. 细菌外膜蛋白的结构与功能[J]. 中国兽医科技, 1999, 29(10): 20-23.
[11] Kim K H, Aulakh S, Paetzel M. The bacterial outer membrane β - barrel assembly machinery[J]. Protein Science, 2012, 21(6): 751-768.
[12] Fang H, Ling K, Ge R, et al. Enhancement of protective immunity in blue gourami, trichogaster trichopterus(pallas), against aeromonas hydrophila and vibrioanguillarum by A. Hydrophila major adhesin[J]. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(2): 137-145.
[13] Cox A J, Hunt M L, Boyce J D, et al. Functional characterization of hgb, a new hemoglobin binding protein of pasteurella multocida[J]. Microbial Pathogenesis, 2003, 34(6): 287-296.
[14] 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[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 419-424.
[15] Biswas T, Chakrabarti M K. Antigenicity and antigenic cross-reactivity of outer membrane proteins of vibrio

- parahaemolyticus[J]. Zentralblatt für Bakteriologie, 1994, 281(4): 475-480.
- [16] Lutwyche P, Exner M M, Hancock R, et al. A conserved aeromonas salmonicida porin provides protective immunity to rainbow trout[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(8): 3137-3142.
- [17] 周 丽, 刘洪明, 战文斌, 等. 鳗弧菌, 藻胶弧菌外膜蛋白的分离及特性[J]. 中国水产科学, 2003, 1(10): 31-35.
- [18] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone[J]. Biochemical Society Transactions, 1996, 24(3): 893-896.
- [19] 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 & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 829-833.
- [20] Xiong X P, Wang C, Ye M Z, et al. Differentially expressed outer membrane proteins of vibrio alginolyticus in response to six types of antibiotics[J]. Marine Biotechnology, 2010, 12(6): 686-695.

Identification and Expression of Immunogenic Protein of *Vibrio Parahaemolyticus*

TIAN Li-hua, YE Zhi-cang, WEN Liang-you, PAN Jian-yi, ZHAO Fu-kun

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: This study screens and identifies outer membrane protein with good immunity in outer membrane protein of vibrio parahaemolyticus using proteomics and immunological technique and lays foundation for the research and development of subunit vaccine for the prevention and treatment of vibrio parahaemolyticus diseases; prepares antiserum using inactivated vibrio parahaemolyticus immunological ICR mice; analyzes screened immunogenic protein through SDS-PAGE and Western Blot of outer membrane protein and identifies immunogenic protein through MALDI-TOF/TOF-MS mass spectrometry; conducts cloning and expression of immunogenic protein VP0802, optimizes expression conditions of this protein and finally purifies protein VP0802; immunizes the mice and obtains antiserum and verifies the immunogenicity of protein VP0802. Results: the titer of antiserum obtained by immunizing mice is $1:5\,000$; it is determined through western blotting analysis that 12 kinds of outer membrane protein have good immunogenicity, 10 among which are identified by mass spectrometry, i. e. LPS-assembly protein, VP0802, Maltoporin, Chi-toporin, OmpC, OmpA, OmpU, OmpK, VP1243 and VP0966. Highly expressed strain of immunogenic protein VP0802 is successfully established; this strain is induced under the condition of low temperature and slow speed of revolution. The target protein still exists in the form of inclusion body. When it is induced under the condition of 37°C , 220 r/min and IPTG final concentration 1 mmol/L, the target protein has the highest expression quantity. This study purifies protein VP0802 obtained and verifies the immunogenicity of this protein. It indicates that many proteins related to immunogenicity exist in outer membrane protein of vibrio parahaemolyticus and some proteins are found to have immunogenicity for the first time.

Key words: vibrio parahaemolyticus; outer membrane protein; immunogenicity; VP0802

(责任编辑: 许惠儿)