DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251118006
引用格式: 汪琦, 李雯, 祝文涛, 等. 副溶血性弧菌外膜蛋白 5’-核苷酸酶的重组表达及免疫原性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(8): 108–117.
WANG Q, LI W, ZHU WT, *et al*. Recombinant expression and immunogenicity study of the outer membrane protein 5’-nucleotidase of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(8): 108–117. (in Chinese with English abstract).

副溶血性弧菌外膜蛋白 5’-核苷酸酶的重组表达及免疫原性研究

汪 琦, 李 雯, 祝文涛, 黄熙然, 王文彬*
(江苏海洋大学海洋食品与生物工程学院, 连云港 222005)

摘 要: 目的 研究副溶血性弧菌新型外膜蛋白 5’-核苷酸酶(5’-nucleotidase, 5’-NT)的免疫原性。**方法** 采用生物信息学方法分析 5’-NT 的序列保守性、结构及抗原表位; 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)克隆该基因, 构建 pET-28a(+)与 5’-NT 基因 *nutA* 的重组质粒并在大肠杆菌中诱导表达, 经镍-次氮基三乙酸琼脂糖亲和层析介质纯化及梯度透析复性获得可溶性重组蛋白; 利用小鼠免疫实验、酶联免疫吸附试验、免疫印迹、补体介导的血清杀菌试验及免疫荧光共聚焦显微镜, 系统评价蛋白的表面暴露性、免疫效价、交叉反应性及免疫保护性。**结果** 5’-NT 在弧菌属具有较高的序列保守性。成功构建了 5’-NT 重组质粒, 通过诱导表达、纯化获得高纯度重组 5’-核苷酸酶蛋白。重组 5’-NT 与副溶血性弧菌全菌免疫血清效价为 1:81k, 具有表面暴露性。重组 5’-NT 免疫血清对 5’-NT 蛋白效价在 1:81k, 对副溶血性弧菌效价在 1:3k, 与其他弧菌属大多存在微弱的交叉反应, 且免疫血清仅有较弱的补体依赖杀菌活性(1:4)。免疫印迹表明, 5’-NT 免疫血清能对副溶血性弧菌及其他弧菌全菌蛋白产生特异性条带。免疫荧光共聚焦显微镜分析也表明了重组 5’-NT 免疫血清能够与副溶血性弧菌发生特异性结合, 也说明该蛋白具有表面暴露性。**结论** 副溶血性弧菌 5’-NT 虽具有弧菌保守性和表面暴露性特征, 但较低的免疫血清效价说明其暴露性、免疫原性或表达丰度有限, 限制了其单独作为疫苗或检测抗原的应用, 后续可通过多抗原联合等策略挖掘其在副溶血性弧菌防控中的价值。本研究揭示了副溶血性弧菌外膜蛋白 5’-NT 的表面暴露性、免疫原性和血清保护性, 为副溶血性弧菌诊断抗原和亚单位疫苗开发提供了参考。

关键词: 副溶血性弧菌; 5’-核苷酸酶; 外膜蛋白; 原核表达; 免疫原性

收稿日期: 2025-11-18
基金项目: 国家自然科学基金项目(32172284)
第一作者: 汪琦(2001—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。E-mail: 15161771315@163.com
***通信作者:** 王文彬(1990—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品质量与安全控制。E-mail: wenbin66@jou.edu.cn

Recombinant expression and immunogenicity study of the outer membrane protein 5’-nucleotidase of *Vibrio parahaemolyticus*

WANG Qi, LI Wen, ZHU Wen-Tao, HUANG Xi-Ran, WANG Wen-Bin*

(*College of Marine Food and Bioengineering*, *Jiangsu Ocean University*, *Lianyungang* 222005, *China*)

ABSTRACT: Objective To study the immunogenicity of the novel outer membrane protein 5’-nucleotidase (5’-NT) from *Vibrio parahaemolyticus*. **Methods** Bioinformatics methods were used to analyze the sequence conservation, structure and B-cell epitopes of 5’-NT; the gene was cloned by polymerase chain reaction (PCR) and the recombinant plasmid pET-28a(+)-*nutA* was constructed and transformed into *Escherichia coli* for induced expression. The soluble recombinant protein was obtained by nickel-chelated nitrilotriacetic acid agarose affinity chromatography purification and gradient dialysis refolding; mice immunization, enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, complement-mediated serum bactericidal assay and immunofluorescence confocal microscopy were used to systematically evaluate the protein’s surface exposure, immunological titer, cross-reactivity and immunoprotective effect. **Results** The results showed that 5’-NT had high sequence conservation in the genus *Vibrio*. The recombinant plasmid of 5’-NT was successfully constructed and the high-purity recombinant 5’-NT was obtained through induced expression and purification. The antibody titer of 5’-NT against the whole-cell immune serum of *Vibrio parahaemolyticus* was 1:81k, which confirmed the surface exposure of this protein. The titer of 5’-NT immune serum against 5’-NT protein was 1:81k, and 1:3k against *Vibrio parahaemolyticus*. It had weak cross-reactivity with most other *Vibrio* species and the immune serum exhibited weak complement-dependent bactericidal activity (1:4). Western blot analysis demonstrated that the immune serum against recombinant 5’-NT could generate specific bands with whole-cell proteins of *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species. Confocal immunofluorescence microscopy analysis further confirmed that the recombinant 5’-NT immune serum specifically bound to *Vibrio parahaemolyticus* which also indicated that this protein possesses surface-exposed characteristics. **Conclusion** Although 5’-NT of *Vibrio parahaemolyticus* exhibits *Vibrio*-conserved and surface-exposed characteristics, its relatively low immune serum titer indicates limited exposure, immunogenicity, or expression abundance. This limits its application as a standalone vaccine or detection antigen. In subsequent studies, combination strategies can be adopted to explore its value in the prevention and control of *Vibrio parahaemolyticus*. This study reveals the surface exposure, immunogenicity, and serum protectivity of the outer membrane protein 5’-NT from *Vibrio parahaemolyticus*, providing a reference for the development of diagnostic antigens and subunit vaccines against this pathogen.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*; 5’-nucleotidase; outer membrane protein; prokaryotic expression; immunogenicity

0　引　言

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)作为一种常见的革兰氏阴性嗜盐性弧菌, 广泛存在于近岸海水、海底沉积物及海产品中[1], 是全球范围内食源性腹泻和急性肠胃炎的重要致病菌之一[2]。随着我国经济水平提高和物流运输业发展, 国内海产品消费量逐渐上升, 副溶血性弧菌感染呈上升趋势, 在中国、美国等国家成为主要食源性致病菌[3–4]。副溶血性弧菌诊断特异性抗原是建立准确、快速免疫检测手段的基础, 也有助于副溶血性弧菌病害的防控。

副溶血性弧菌的致病机制复杂, 其毒力因子包括耐热直接溶血素(thermotolerant direct hemolysin, TDH)[5]、耐热相关溶血素(tdh-related hemolysin, TRH)[6]、III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)[7]等, 这些毒力因子在不同菌株中的分布存在显著差异[8–9]。近年来, 外膜蛋白因其在革兰氏阴性菌表面的广泛分布、结构相对保守性及与细菌黏附、侵袭、营养吸收等生理功能的密切关联[10], 成为细菌疫苗研发的重要靶标。目前已证实外膜蛋白 U (outer membrane protein U, OmpU)、外膜蛋白 A (outer membrane protein A, OmpA)、外膜蛋白 K (outer membrane protein K,

OmpK)等可激发宿主特异性免疫反应[11–13]。

在副溶血性弧菌的众多外膜蛋白中，5’-核苷酸酶(5’-nucleotidase, 5’-NT)是一种具有磷酸水解酶活性的外膜结合蛋白，能够催化 5’-核苷酸(如腺苷酸、鸟苷酸等)的磷酸基团水解，生成相应的核苷和磷酸[14]。研究表明，该酶在细菌的能量代谢、营养获取及逃避宿主免疫防御过程中发挥重要作用：一方面，其水解产物核苷可被细菌吸收利用，作为碳源和氮源支持细菌在营养匮乏的宿主内环境中生长；另一方面，该酶可能通过调节宿主组织中的核苷酸水平，影响宿主免疫细胞(如巨噬细胞、中性粒细胞)的活化和细胞因子分泌，从而帮助细菌逃避免疫清除[15]。在霍乱弧菌中，5’-NT 通过调节巨噬细胞和肥大细胞的胞外腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)水平，激活 P2Z ($P2X_7$)受体，加速吞噬细胞死亡，帮助其逃避宿主防御[16]。罗伊氏乳杆菌的 5’-NT 是其在调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)缺陷模型中发挥抗自身免疫作用的核心介质，通过生成腺苷及肌苷代谢物、调节免疫细胞亚群，为治疗 Tregs 相关免疫疾病提供了新机制和依据[17]。5’-NT 是流感嗜血杆菌[18]、猪链球菌[19]毒力因子之一，提示其在副溶血性弧菌疫苗研发中具有潜在的应用前景。目前还未有报道系统研究副溶血性弧菌 5’-NT 的免疫原性和免疫保护性，跨物种研究无法直接为副溶血性弧菌该蛋白的研究提供精准参考。

本研究基于前期表面蛋白组学筛查结果，聚焦于在副溶血性弧菌中鉴定出的新型外膜蛋白 5’-NT[20]。旨在通过分子克隆技术构建原核重组表达载体，诱导表达以获得高纯度的 5’-NT 重组蛋白；随后进行小鼠免疫，通过酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫印迹、补体依赖血清溶菌试验及免疫荧光共聚焦显微镜，进一步研究重组 5’-NT 蛋白免疫血清的表面暴露性、免疫效价、交叉反应性及免疫血清杀菌活性，为开发新型副溶血性弧菌检测抗原或疫苗抗原提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究所用的原核表达载体 pET-28a(+)、大肠杆菌 DH5α、Rosetta (DE3)、副溶血性弧菌 CICC 21618 ΔLPS[在 CICC 21618 基础上敲除了 *HldE*，表现为脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)表型完全缺失(本实验室构建)，后文简称 ΔLPS]、副溶血性弧菌 CICC 21618 ΔCPS[在 CICC 21618 基础上敲除了 *kpsD*、*kpsM*、*kpsT* 和 *kpsE* 的连续 DNA 片段，表现为荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)表型部分缺失(本实验室构建)，后文简称 ΔCPS]均由本实验室保存；其他副溶血性弧菌等测试菌株为从中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center of Industrial Culture Collection, CICC)、中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)、中国海洋微生物菌种保藏管理中心(Marine Culture Collection of China, MCCC)等获得。雌性 Balb/c 小鼠购于扬州大学兽医学院。

胰蛋白胨、酵母提取物、咪唑(纯度≥99%)、聚乙二醇(20000 Da)、多聚甲醛(分析纯)、尿素(纯度≥99.0%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)；*Bam*HI快切酶、*Xho*I快切酶、细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒、EZ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、DNA 分子量标准 Marker、双色预染蛋白 Marker、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)所需试剂、异丙基硫代 *β-D*-半乳糖苷(isopropyl *β-D*-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、镍-次氮基三乙酸(nickel-nitrilotriacetic acid, Ni-NTA)琼脂糖纯化树脂、小鼠抗 6X His Tag 单克隆抗体[生工生物工程(上海)股份有限公司]；高保真聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)酶 PrimeSTAR® Max [宝日医生物技术(北京)有限公司]；ClonExpress®II一步克隆试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)；弗氏完全佐剂(免疫学专用级)、不完全佐剂(免疫学专用级)、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA, 纯度≥98%)(美国 Sigma 公司)；标准羊抗鼠二抗免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)(美国 Jackson Immuno Research 公司)；豚鼠血清(补体)冻干粉(北京索莱宝科技有限公司)；氯化钠(纯度≥99.5%)、七水合磷酸氢二钠(纯度≥98.0%)、二水合磷酸二氢钠(纯度≥99.0%)(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

QYSH-6 电热恒温水浴锅(上海精密仪器仪表有限公司)；XQC-100A 高压蒸汽灭菌锅(上海申安仪器公司)；GL124I-1SCN 电子天平(精度 0.1 mg，德国 Sartorius 公司)；HZQ-X100 恒温振荡培养箱(上海捷呈实验仪器有限公司)；1300 系列II级 A2 型生物安全柜、Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪[赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司]；KH22R 高速冷冻离心机(湖南湘怡电子科技有限公司)；JY93-IIN 超声波破碎仪(上海一恒科学仪器有限公司)；T100™聚合酶链式反应仪、PowerPac™通用电泳仪电源、Mini-PROTEAN® Tetra 电泳槽、小型 Mini Trans-Blot®转印槽、GelDoc Go 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)；WIX-midiDNA 多用途水平电泳槽[韦克斯科技(北京)有限公司]；DYY-6C 电泳仪电源(北京市六一仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 5’-NT 的生物信息学分析

副溶血性弧菌外膜蛋白 5’-NT (NP_797127.1 或

WP_005481350.1)的氨基酸序列从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的蛋白数据库中获得, 采用DNAMAN 6.0软件对本研究中的 5'-NT 氨基酸序列和 NCBI 其他菌株的氨基酸序列进行基本局部比对搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)比对分析。利用 MEGA 6.0 软件的邻接法构建系统发育树, bootstrap 法重复抽样次数为 1000 次。蛋白质三维结构使用 trRosetta[21]算法在线生物信息学网站进行模拟, 再利用 Pymol 1.8.2.2 软件进行标记和分析。采用 Protean 7.1.0 软件对 5'-NT 进行生物信息学分析。

1.3.2　*5'-NT* 基因的克隆、重组与转化

根据 pET-28a(+)质粒的多克隆位点, 选择合适的 2 个酶切位点, 上游和下游酶切位点分别为 *Bam*HI和 *Xho*I, 并按照一步克隆试剂盒的说明在插入片段正反向扩增引物的 5'-端引入线性化载体两末端同源序列, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计用于扩增 5'-NT 编码基因 *nutA* 的引物。上游引物为 5'-CAGCAAATGGGTCGCGGATCCGGAAAAAAAAATGAATCAGCGTC-3', 下游引物为 5'-GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGCAAACTCTATTGATTGACCACAT-3'。提取副溶血性弧菌 CCIC 21618 的基因组作为模板, *5'-NT* 基因 PCR 参数为 98 ℃ 3 min, 98 ℃ 10 s, 63.5 ℃ 5 s, 72 ℃ 1.5 min, 33 个循环, 最后延伸至 72 ℃ 5 min。pET-28a(+)进行 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切。琼脂糖凝胶电泳验证产物。*5'-NT* 基因和 pET-28a(+)双酶切后产物用 ClonExpress®II一步克隆试剂盒连接, 将成功连接的重组质粒命名为 pET-28a(+)-*nutA*。将重组质粒 pET-28a(+)-*nutA* 转化到大肠杆菌 DH5*α* 中, 筛选阳性克隆, 用双酶切法和委托生工生物工程(上海)股份有限公司 DNA 测序进行鉴定。将鉴定正确的 pET-28a(+)-*nutA* 转化到大肠杆菌 Rosetta (DE3)。

1.3.3　5'-NT 蛋白表达与纯化

蛋白表达与纯化参考文献[22], 部分条件有所调整。诱导条件改为将 pET-28a(+)-*nutA* 大肠杆菌 Rosetta (DE3)培养物以 1%的比例加入含 50 mg/L 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基(1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%氯化钠)中, 37 ℃、180 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.6 时, 加入 0.8 mmol/L 的 IPTG, 分别继续孵育 12 h; 冰浴超声破碎前用结合缓冲液(20 mmol/L 七水合磷酸氢二钠、20 mmol/L 二水合磷酸二氢钠、0.5 mol/L 氯化钠、10 mmol/L 咪唑, 溶于适量超纯水后调 pH 至 7.4, 定容至 1 L, 0.22 μm 或 0.45 μm 过滤除菌)重悬菌体; 梯度复性时尿素浓度梯度为 6、4、2、1、0 mol/L, 每次透析 4 h; 浓缩使用透析袋(截留分子量 3.5 kDa)和聚乙二醇(20000 Da)浓缩。

1.3.4　5'-NT 表面暴露性评价

通过重组 5'-核酸酶(recombinant 5'-nucleotidase, r5'-NT)与各种全菌血清的间接 ELISA, 评价 5'-NT 在副溶血性弧菌 CICC 21618 表面的暴露性, 间接 ELISA 法参照文献[23], 部分条件有所调整。纯化的蛋白用碳酸盐缓冲液(carbonate buffer solution, CBS, pH 为 9.6)稀释到 10 μg/mL, 包被 96 孔酶标板中; 一抗小鼠血清使用副溶血性弧菌 CICC 21618 全菌血清、ΔLPS 全菌血清、ΔCPS 全菌血清和空白血清, 1000 倍开始, 3 倍梯度稀释 6 个梯度, 并用稀释液作阴性对照; 二抗为稀释 4000 倍的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗鼠 IgG (0.5 μg/mL)。

1.3.5　r5'-NT 免疫血清的免疫效价以及交叉反应性评价

小鼠免疫参照文献[23], 实验组免疫弗氏佐剂乳化的 r5'-NT, 空白组小鼠免疫弗氏佐剂乳化的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, pH 为 7.2), 第 3 次免疫后一周对小鼠进行采眼球血, 获得血清并于–20 ℃保存。通过间接 ELISA 评价各种细菌与 r5'-NT 免疫血清的效价和交叉反应, 间接 ELISA 操作同 1.3.4。用 CBS 将不同测试菌的浓度稀释到 10^8 CFU/mL, 包被酶标板, 一抗为 r5'-NT 免疫血清, 1000 倍开始, 3 倍梯度稀释 6 个梯度, 并用稀释液作阴性对照, 二抗为稀释 4000 倍的 HRP 标记羊抗鼠 IgG (0.5 μg/mL)。通过各种细菌全菌蛋白与 r5'-NT 免疫血清的免疫印迹, 评价 r5'-NT 免疫血清的特异性结合和交叉反应, 免疫印迹方法参考文献[22], 部分条件有所调整。一抗为 r5'-NT 免疫血清稀释液(稀释 1000 倍数); 二抗为稀释 4000 倍的 HRP 标记羊抗鼠 IgG (0.5 μg/mL)。

1.3.6　补体介导的 r5'-NT 免疫血清杀菌试验

本实验参考文献[24–25]。简要步骤为, r5'-NT 免疫血清在恒温水浴锅中 56 ℃水浴 30 min 灭活补体。向 35 μL 的血清加入 35 μL 的 PBS, 依次 2 倍稀释 7 个梯度, 再加入适量工作菌液(终浓度为 10^5 CFU/mL)和豚鼠补体(终浓度为 10%)。豚鼠补体浓度通过单因素实验优化获得。于 37 ℃、100 r/min 培养 1 h, 每个重组蛋白免疫血清设置补体对照和灭活补体对照。孵育后的混合液均匀涂布于 LB 平板中, 37 ℃倒置培养 12 h, 次日对混合菌液平板计数。

1.3.7　5'-NT 表面位置的免疫荧光共聚焦显微镜分析

参考文献[26], 部分条件有所调整。取 2 mL OD_{600} 为 0.6 左右的副溶血性弧菌 CICC 21618 菌液, 5000×*g*, 10 min 离心弃上清, 4%多聚甲醛固定; 一抗为稀释 1000 倍的 r5'-NT 免疫血清; 二抗为稀释 500 倍的 iF555-Tyramide 标记的山羊抗小鼠 IgG。

1.4　数据处理

所有数据均来自 3 次独立的重复实验, 每个处理组均设 3 个技术重复。所有统计分析均采用 SPSS 27、Origin 2018 完成。计算各稀释度血清的 *P*/*N* 值(阳性血清 OD_{450} 值/空白对照 OD_{450} 值), 以 $P/N \geqslant 2.1$ 时的最高稀释度作为血清效价; 组间吸光度值差异采用单因素方差分析, 两两比较采用 Duncan 多重比较法。显著性水平设定为 $P<0.05$, 图表中以不同字母标记组间显著差异。补体依赖血清溶菌试验

按公式(1)计算存活率:

细菌存活率/%=(样本菌落形成单位数/补体对照菌落形成单位数)×100% (1)

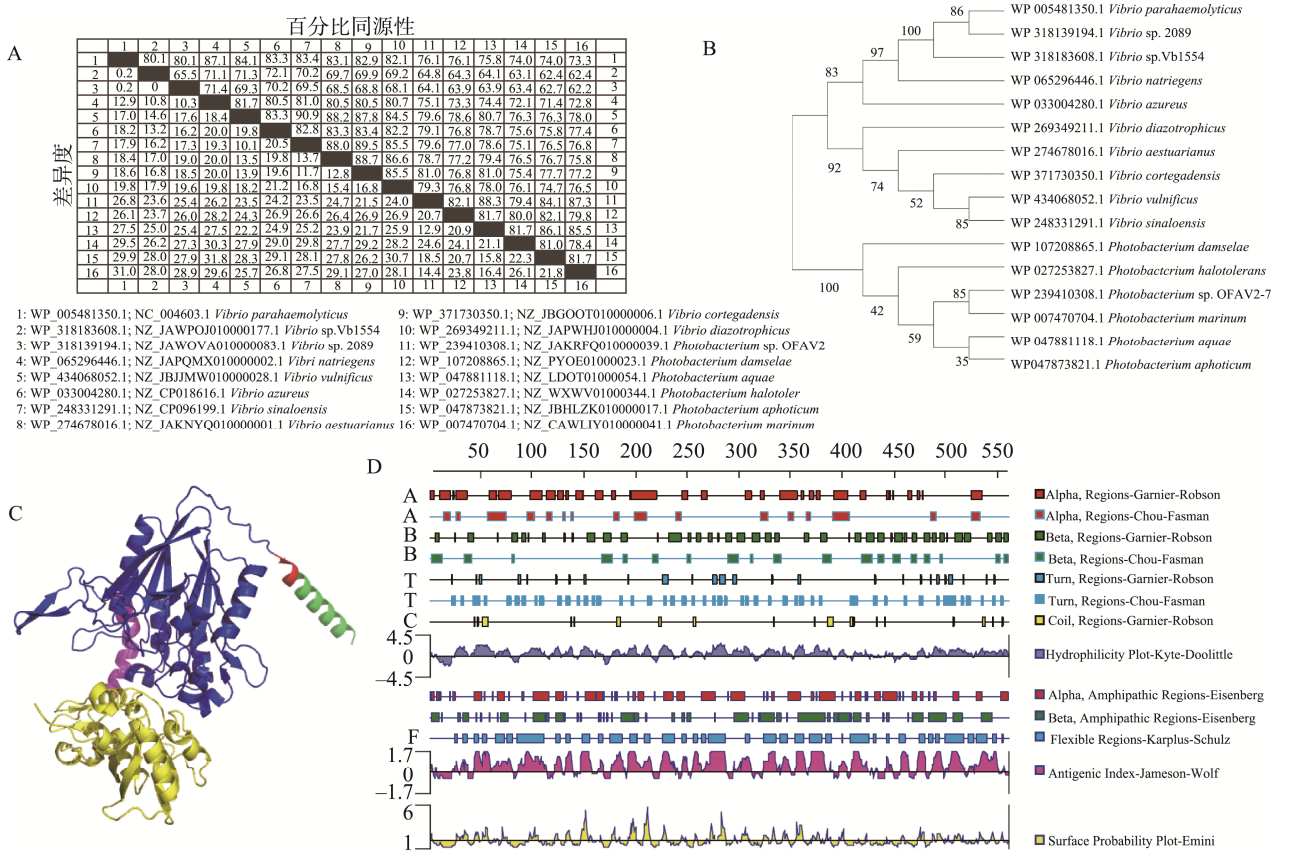
以存活率小于等于50%判定为具有杀菌活性，组间存活率差异采用独立样本 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 5'-NT 的生物信息学分析

同源性分析结果表明(图 1A)，5'-NT 与其他弧菌属序列的一致性在 80%以上，表明该蛋白具有较高的保守性，与发光杆菌的蛋白序列一致性在 73%~77%，处于一个相对较高的水平，但相对于弧菌属内的一致性较低，说明该蛋白在弧菌属和发光杆菌属之间有明显的序列差异，这体现了该蛋白具有较好的特异性。该蛋白的系统进化树显示(图 1B)，*Vibrio parahaemolyticus*、*Vibrio* sp. 2089、*Vibrio* sp. Vb1554 以 86、100 的高 Bootstrap 值聚为一支，说明这 3 个菌株的 5'-NT 亲缘关系极近。该小分支又与 *Vibrio natriegens*、*Vibrio azureus* 等以 83、97 的高支持率进一步聚类，说明它们同属弧菌属内的一个紧密演化支。*Vibrio diazotrophicus* 等聚为另一支，节点 Bootstrap 值为 92、74、85，支持率整体较好，说明它们是弧菌属内的另一亚类群。*Photobacterium damselae* 单独为一支，与其他发光杆菌属物种分化较早，其余发光杆菌属物种聚为一支。

trRosetta 蛋白结构模拟显示(图 1C)，模拟的 5'-NT 结构 Tm 值为 0.917，大于 0.5，说明蛋白结构质量良好。蛋白由两个结构域通过 α 螺旋(图 1C，洋红色)连接，C 端结构域负责结合底物碱基(图 1C，黄色，365~560)，N 端结构域负责核心催化步骤(图 1C，蓝色，23~345)[14]。N 端丝氨酸(Ser)-亮氨酸(Leu)-丙氨酸(Ala)-甘氨酸(Gly)-半胱氨酸(Cys)(图 1C，红色，18~22)与革兰氏阴性菌脂蛋白信号切割位点的共有序列亮氨酸(Leu)-亮氨酸(Leu)-丙氨酸(Ala)-甘氨酸(Gly)-半胱氨酸(Cys)序列非常相似，推测该酶通过脂质部分锚定在外膜[27]。如图 1D，表面可能性预测曲线中，150~400 指数值较高，表明该区域氨基酸暴露于表面，可能是与核苷酸的极性基团形成相互作用的活性中心区域。抗原指数在 150~350 位有明显高峰，表明这些区域免疫原性较强，说明这些区域既暴露于蛋白表面，又具有强抗原性，是潜在的抗原表位。



注: A. 蛋白序列同源性分析; B. 系统发育树; C. 蛋白三维结构预测; D. 蛋白序列生物信息学分析。

图 1 5'-NT 生物信息学分析

Fig.1 Bioinformatics analysis of 5'-NT

2.2　*5'-NT* 基因的克隆、表达和蛋白纯化

如图 2A, 泳道 1 所示, PCR 获得的基因片段在 1500 bp 和 2000 bp 之间, 理论 PCR 产物包括 *5'-NT* 基因(1683 bp)、两端酶切位点(共 12 bp)和两端同源臂(共 30 bp), 一共 1725 bp, 两者大小相当。如图 2A, pET-28a(+)(泳道 2)在双酶切后(泳道 3)获得质量良好的条带。目的基因与双酶切质粒成功连接, 转入 DH5α。从 DH5α 提取重组质粒, 双酶切鉴定重组质粒, 得到 2 条带(图 2B, 泳道 3), 分别与双酶切质粒条带位置(图 2B, 泳道 1)和目的基因条带位置(图 2B, 泳道 2)相同。测序结果显示, 重组质粒中插入的 *5'-NT* 基因与 21618 基因组中的基因完全一致。这些结果共同表明重组质粒构建成功。

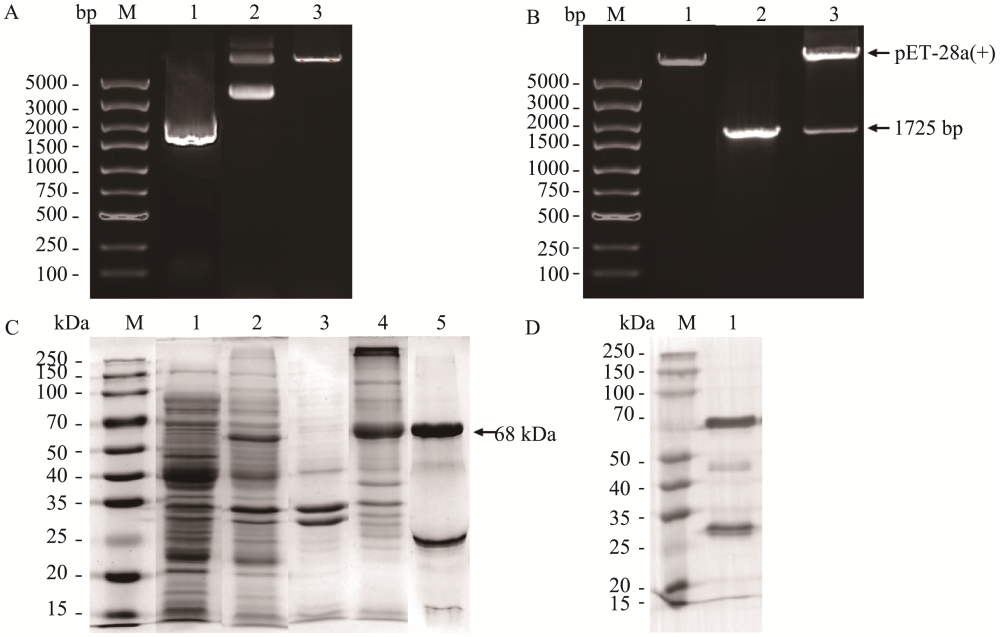
重组质粒转化后诱导表达, 经 Ni-NTA 琼脂糖纯化树脂纯化获得 r5'-NT, SDS-PAGE 分析表明该蛋白为包涵体, 大小约为 68 kDa(图 2C, 泳道 5), 与预期结果一致。25 kDa 和 35 kDa 之间有一条较为明显的条带, 经过 6×His tag 抗体免疫印迹鉴定(图 2D, 泳道 1), 该处蛋白也带有 6×His tag, 推测为目的蛋白的降解产物。蛋白纯化后经过梯度复性, 变为可溶性蛋白, 浓缩后测得质量浓度为 1.4 mg/mL。

2.3　5'-NT 表面暴露性评价结果

以 r5'-NT 蛋白包被酶标板, 间接 ELISA 方法检测分析副溶血性弧菌 CICC 21618 全菌血清、ΔLPS 全菌血清、ΔCPS 全菌和空白血清, 如图 3A, r5'-NT 蛋白对 ΔLPS 全菌血清的平均吸光度最高(1.961), 其次是 ΔCPS (1.448)和 CICC 21618 (1.123), 空白血清吸光度最低(0.333), 不同组间存在显著性差异(P<0.05)。如图 3B, CICC 21618 全菌血清对 r5'-NT 效价为 1:27k, 两种突变株血清对 r5'-NT 效价为 1:81k。说明 5'-NT 具有表面暴露性, 蛋白的暴露性受到表层多糖的影响, 脂多糖缺失能显著提高该蛋白的暴露性。而 BSA 对上述血清的平均吸光值仅在 0.132~0.227 之间, 说明全菌血清与 r5'-NT 的结合为特异性反应。

2.4　r5'-NT 免疫血清的免疫效价、交叉反应性及免疫保护性评价结果

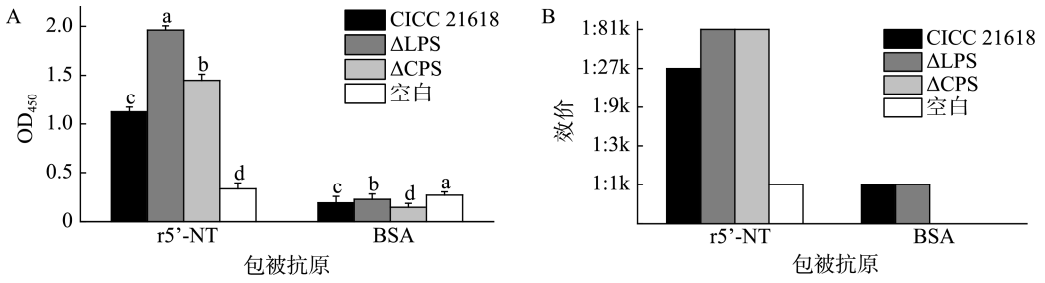
如图 4A 所示, r5'-NT 免疫血清对 r5'-NT (21)和大肠杆菌属 O157:H7 等的平均吸光值较高(2.464~2.540), 与副溶血性弧菌等(1~4)和坎氏弧菌等弧菌属(5~11)的平均吸光值较低(0.577~0.715), 空白血清对大肠杆菌属 O157:H7 和双壳气单胞菌等杂菌的平均吸光值较高(0.979~1.193), 与副溶血性弧菌等(1~4)和坎氏弧菌等弧菌属(5~11)的平均吸光值较低(0.205~0.534)。如图 4B 所示, r5'-NT 免疫血清对 r5'-NT 的效价高达 1:81k, 而对弧菌和其他细菌菌体的效价大多仅为 1k~3k, 并且空白血清对 r5'-NT、副溶血性弧菌等(1~4)和坎氏弧菌等弧菌属(5~11)的效价最高仅有 1:1k, 最低没有效价, 说明免疫过程诱导产生了 r5'-NT 的抗体, 但血清与菌体的识别性较弱。图 4C 表明, r5'-NT 免疫血清与 5 株副溶血性弧菌以及 7 株其他弧菌的全菌蛋白在 50~70 kDa 出现印迹条带, 与 5'-NT (68 kDa)分子量大小一致, 该条带



注: A. 基因扩增和质粒双酶切[M: DNA 分子量标准 5000 bp; 1: *5'-NT* 基因 PCR 产物; 2: 原 pET-28a(+)质粒; 3: 双酶切后 pET-28a(+)质粒]; B. pET-28a(+)-*nutA* 双酶切鉴定[M: DNA 分子量标准 5000 bp; 1: 双酶切后 pET-28a(+)质粒; 2: *5'-NT* 基因 PCR 产物; 3: pET-28a(+)-*nutA* 双酶切产物]; C. SDS-PAGE 分析蛋白诱导纯化(M: 蛋白分子量标准 250 kDa; 1, 2: 未诱导上清、沉淀; 3, 4: 诱导后上清、沉淀; 5: 纯化浓缩后重组蛋白); D. 免疫印迹鉴定蛋白纯化(M: 蛋白分子量标准 250 kDa; 1: 纯化后重组蛋白)。

图 2　*5'-NT* 基因的克隆、表达与蛋白纯化

Fig.2　Cloning, expression and protein purification of the *5'-NT* gene

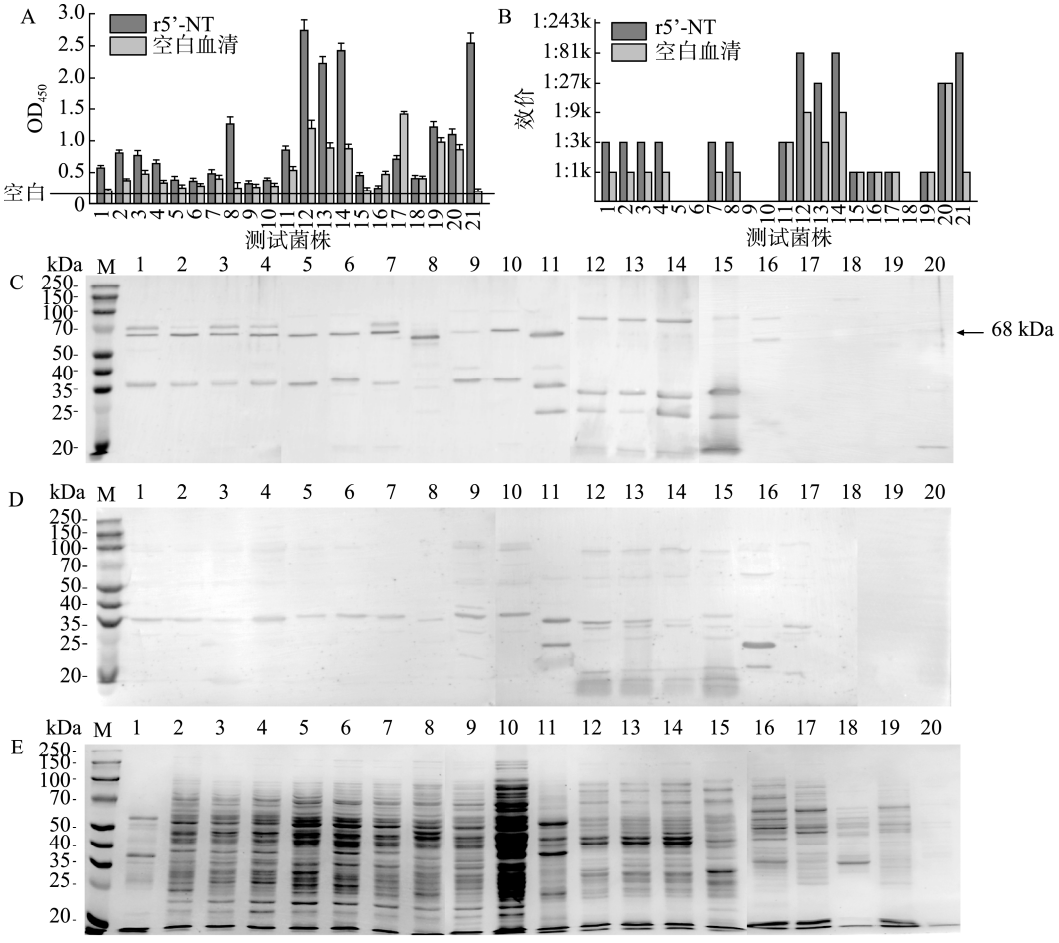


注: A. r5'-NT、BSA 分别与不同全菌免疫血清间接 ELISA 吸光值对比; B. r5'-NT、BSA 分别与不同全菌免疫血清间接 ELISA 效价对比。每根柱体上不同的字母代表相同蛋白在不同血清之间吸光度存在显著性差异(P<0.05)。

图 3 间接 ELISA 法测定 3 种全菌蛋白免疫血清对 r5'-NT 效价

Fig.3 Determination of the titer of 3 kinds of whole bacterial protein immune sera against r5'-NT by indirect ELISA

在弧菌属外的全菌蛋白印迹中均未出现。在图 4C 中还出现了 35 kDa 等印迹条带, 图 4D 表明, 这些条带在对照组(仅免疫 PBS 和佐剂)血清同样出现, 说明这些非特异性条带并非 r5'-NT 免疫产生, 可能由于非处理因素如佐剂等引起。不同测试菌株全菌蛋白的考染图(图 4E)显示, 全菌蛋白条带丰富, 可以用于印迹分析。上述结果说明, r5'-NT 免疫血清能与大部分弧菌的 5'-NT 蛋白产生特异性反应, 5'-NT 在弧菌属具有较高的保守性和特异性。



注: A. 间接 ELISA 吸光值(血清稀释 1000 倍); B. 间接 ELISA 效价; C. r5'-NT 血清免疫印迹; D. 对照组血清免疫印迹; E. 各菌株全菌蛋白 SDS-PAGE 图; M: 蛋白分子量标准 250 kDa; 1: VP CICC 21618; 2: VP CICC 21619; 3: VP CICC 1.1616; 4: VP CGMCC 21528; 5: 坎氏弧菌; 6: 哈氏弧菌; 7: 霍氏格里蒙特氏菌; 8: 拟态弧菌; 9: 魔鬼弧菌; 10: 解藻酸弧菌; 11: 非 1 型霍乱弧菌; 12: 大肠杆菌 O157:H7; 13: 大肠杆菌 BL21; 14: 大肠杆菌 DH5α; 15: 阴沟肠杆菌; 16: 美人鱼发光杆菌; 17: 双壳气单胞菌; 18: 杀鲑气单胞菌; 19: 兽气单胞菌; 20: 金黄色葡萄球菌; 21: r5'-NT。

图 4 间接 ELISA (A~B)、免疫印迹(C~D)和考马斯亮蓝染色法(E)分析 r5'-NT 免疫血清对副溶血性弧菌等测试菌株的识别效果

Fig.4 Analysis of the Recognition effect of r5'-NT immune serum on *Vibrio parahaemolyticus* and other test strains by indirect ELISA (A-B), western blot (C-D) and Coomassie Brilliant blue staining (E)

2.5　补体介导的 r5’-NT 免疫血清杀菌试验结果

在前期预实验中，10%的豚鼠补体浓度足以发挥重组蛋白免疫血清的全部杀菌能力。根据杀菌滴度公式计算得到 r5’-NT 免疫血清的杀菌滴度为 1:4，此时对照组平板平均长出 125 CFU，实验组平板平均长出 40 CFU，继续稀释对照组与实验组菌落数差异未达到 50%(图 5)，上述结果表明 r5’-NT 免疫血清具有杀菌效果，但较为有限。

2.6　5’-NT 表面位置的免疫荧光共聚焦显微镜分析结果

在两个实验组中蓝色荧光均可清晰标记出副溶血性弧菌 CICC 21618 的形态与分布，说明该细菌被 4’,6-二脒基-2-苯基吲哚(4’,6-diamidino-2-phenylindole，DAPI)成功染色。在 r5’-NT 血清处理组中，Merge 通道显示红色荧光(iF555-tyramide 标记的鼠二抗)的分布模式与细菌形态高度匹配(图 6)，说明 r5’-NT 免疫血清能够与副溶血性弧

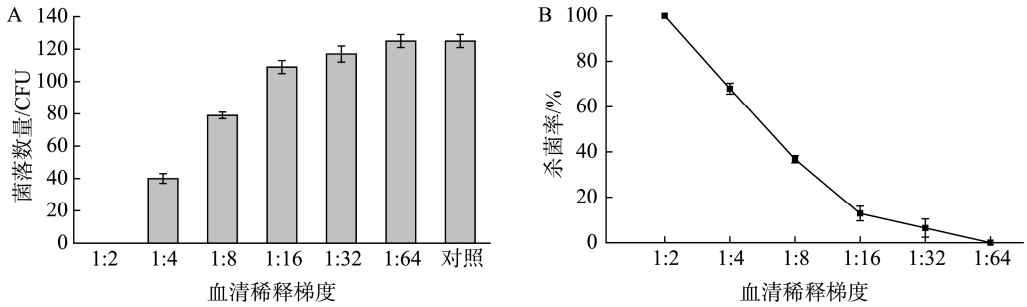


图 5　r5’-NT 免疫血清不同稀释梯度下的菌落数量和杀菌率

Fig.5　Colony count and bactericidal rate of r5’-NT immune serum under different dilution gradients

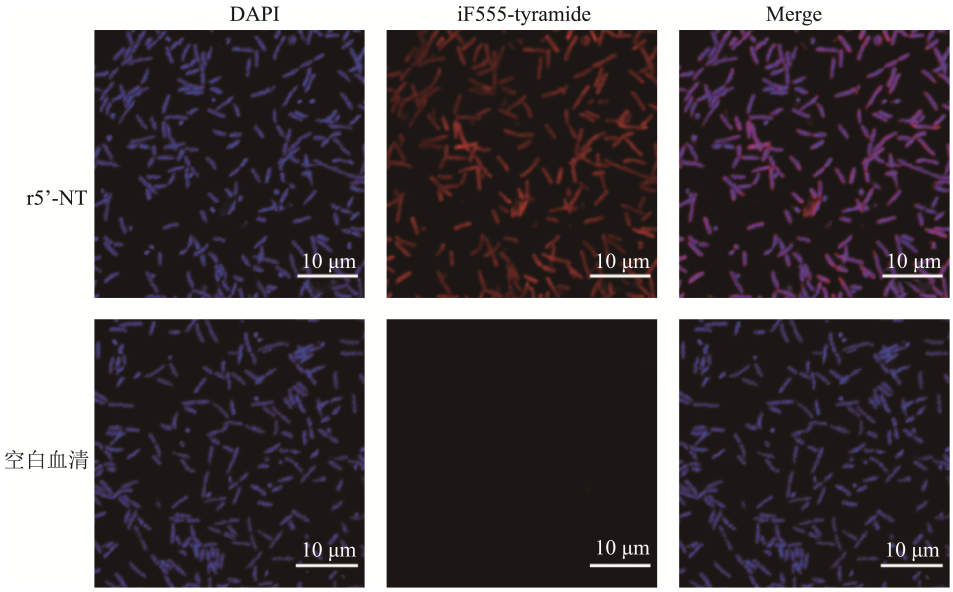


图 6　r5’-NT 免疫血清及空白血清与副溶血性弧菌 CICC 21618 共聚焦单标染色成像

Fig.6　Confocal single-label immunofluorescence imaging of *Vibrio parahaemolyticus* CICC 21618 with r5’-NT immune serum and blank serum

菌特异性结合。空白血清组未出现红色荧光，说明空白血清未能与副溶血性弧菌特异性结合。

3　讨论与结论

副溶血性弧菌等引起的弧菌病害不仅对水产养殖造成严重经济损失，还威胁着海产品等的食用安全[28–30]。副溶血性弧菌依赖 5’-NT 水解单磷酸腺苷(adenosine monophosphate，AMP)，通过 Na^+-AMP 共转运系统摄取产物，用于能量与核酸合成，适配肠道营养环境[31]。血红链球菌表面 5’-NT 通过腺苷生成抑制血小板聚集，同时也起到免疫抑制作用[32]。罗伊氏乳杆菌、猪链球菌中的 5’-NT 与血红链球菌类似，均通过生成腺苷来影响免疫细胞产生前炎症因子，抑制宿主的免疫反应[17,19]。因此，发掘新型副溶血性弧菌特异性抗原 5’-NT 对于开发快速检测副溶血性弧菌的诊断抗体和水产疫苗具有重要意义[33]。

本研究通过重组表达和免疫学技术，评价了副溶血性弧菌新型外膜蛋白 5’-NT 的免疫原性。副溶血性弧菌 5’-NT 在弧菌属中的序列一致性达 80%以上，免疫印迹表明免疫

血清可与多种副溶血性弧菌及其他弧菌全菌蛋白特异性结合，表明该蛋白具有弧菌属保守性和特异性。免疫荧光共聚焦显微镜分析也表明了 r5’-NT 免疫血清能够与副溶血性弧菌发生特异性结合，说明该蛋白具有表面暴露性。但该蛋白免疫血清对弧菌菌体的结合效价仅 1:1k~1:3k，且免疫血清仅有较弱的补体依赖杀菌活性(1:4)。与流感嗜血杆菌 5’-NT 的免疫原性(血清 ELISA 滴度 1:17k~1:43k，杀菌滴度 1:40)[18]相比，效果相对较弱。结合相关研究，不同的副溶血性弧菌外膜蛋白之间免疫原性差异较大。*β*-桶装配机器蛋白 A (*β*-barrel assembly machinery A, BamA)免疫原性结果与 5’-NT 类似，虽有较高的保守性和特异性，但血清与弧菌结合效价仅有 0.5k[34]。外膜蛋白 VP0082 和 TonB 血清效果略好，与弧菌结合效价在 4.5k~13.5k[23]。

外膜蛋白的免疫保护性受到多种因素影响，包括表面暴露性、表达丰度、抗原表位暴露等[35–37]，结合各种因素，分析 5’-NT 具有较弱免疫效价和保护性的原因可能有以下几个方面。首先，5’-NT 在菌体表面的暴露性有限(1:27k)，与副溶血性弧菌全菌血清结合效价不强，而与 LPS 和 CPS 突变株血清结合效价较高(1:81k)，推测 LPS 会掩盖其抗原表位，影响免疫识别。其次，蛋白表达丰度也可能有影响，高表达丰度能结合更多针对该蛋白的抗体。然后，5’-NT 蛋白表达后存在降解条带，复性过程可能导致构象不稳定，抗原位点未能暴露在外。最后，免疫血清与其他弧菌的交叉反应性较弱，保护谱有限。总之，多方面因素影响了 r5’-NT 免疫血清的免疫原性和免疫反应性。

本研究系统探究了副溶血性弧菌 5’-NT 重组蛋白的制备及其免疫原性，揭示了该外膜蛋白作为免疫检测抗原，或单独作为亚单位疫苗的局限性。基于本研究的结果，未来可从以下方面进一步探索：(1)优化重组蛋白的表达和复性条件，提高其天然构象的恢复率，提高蛋白稳定性；(2)将 5’-NT 作为多抗原联合疫苗的组分，弥补单一抗原保护谱窄的问题，助力副溶血性弧菌病害防控。

参考文献

[1] ZAKARIA HN, RAHIM AEDN, ROSILAN FN, *et al*. Global landscape of *Vibrio parahaemolyticus* research: A bibliometric analysis [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2025, 41(2): 45.

[2] NAMADI P, DENG Z. Optimum environmental conditions controlling prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in marine environment [J]. Marine Environmental Research, 2023, 183: 105828.

[3] LIU D, ZHOU L, ZHANG Z, *et al*. Epidemiological and genomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported travelers at the port of Shanghai, China (2017—2019) [J]. BMC Microbiology, 2024, 24(1): 145.

[4] 吴鹏, 刘继开, 戴月, 等. 2010—2020 年中国大陆副溶血性弧菌引发食源性疾病暴发调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(1): 73–78.
WU P, LIU JK, DAI Y, *et al*. Investigation of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* in China’s Mainland from 2010 to 2020 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(1): 73–78.

[5] PARIA P, YADAV S, BISWAS P, *et al*. Structure-based screening and *in vitro* validation of potentially druggable molecules against *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin (TDH) protein [J]. Microbial Pathogenesis, 2025, 210: 108140.

[6] PARK SB, ZHANG Y. Development of multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) combined with lateral-flow dipstick (LFD) assay to detect species-specific *tlh* and pathogenic *trh* and *tdh* genes of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Pathogens, 2024, 13(1): 57.

[7] TANDHAVANANT S, TERASHIMA H, HIYOSHI H, *et al*. Regulatory mechanism for host-cell contact-dependent T3SS gene expression in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. mSystems, 2025, 10(7): e0025125.

[8] YAN W, CHEN L, JI L, *et al*. Prevalence and genomic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from a vast amount of aquatic products in Huzhou, China [J]. Foods, 2025, 14(14): 2481.

[9] 王兆娥, 张志敏, 余红, 等. 2016—2024 年北京市丰台区食源性致病菌副溶血性弧菌监测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(22): 49–54.
WANG ZE, ZHANG ZM, YU H, *et al*. Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* monitoring results of foodborne diseases in Fengtai District, Beijing City from 2016 to 2024 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(22): 49–54.

[10] ROLLAUER SE, SOORESHJANI MA, NOINAJ N, *et al*. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2015, 370(1679): 20150023.

[11] ZHAO X, LIU Y, YAN F, *et al*. *OmpU* and *OmpC* are the key OMPs for *Litopenaeus vannamei* hemocyanin recognizes *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2024, 146: 109409.

[12] SILVARAJ S, MD-YASIN IS, MM AK, *et al*. Elucidating the efficacy of vaccination against Vibriosis in *Lates calcarifer* using two recombinant protein vaccines containing the outer membrane protein K (r-OmpK) of *Vibrio alginolyticus* and the DNA chaperone J (r-DnaJ) of *Vibrio harveyi* [J]. Vaccines (Basel), 2020, 8(4): 660.

[13] VALERO-PACHECO N, BLIGHT J, ALDAPA-VEGA G, *et al*. Conservation of the OmpC porin among typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* serovars [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 2966.

[14] ITAMI H, SAKAI Y, SHIMAMOTO T, *et al*. Purification and characterization of membrane-bound 5’-nucleotidase of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Biochemistry, 1989, 105(5): 785–789.

[15] ZAKATAEVA NP. Microbial 5’-nucleotidases: their characteristics, roles in cellular metabolism, and possible practical applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(20): 7661–7681.

[16] PUNJ V, ZABORINA O, DHIMAN N, *et al*. Phagocytic cell killing mediated by secreted cytotoxic factors of *Vibrio cholerae* [J]. Infection and Immunity, 2000, 68(9): 4930–4937.

[17] LIU Y, ARMBRISTER SA, OKEUGO B, *et al*. Probiotic-derived ecto-5’-nucleotidase produces anti-inflammatory adenosine metabolites in treg-deficient scurfy mice [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2023, 15(4): 1001–1013.

[18] ZAGURSKY RJ, OOI P, JONES KF, *et al*. Identification of a *Haemophilus* influenzae 5'-nucleotidase protein: Cloning of the *nucA* gene and immunogenicity and characterization of the NucA protein [J].

Infection and Immunity, 2000, 68(5): 2525–2534.

[19] 王卫雪. 猪链球菌脑膜炎株的病原特性及其 5’-核苷酸酶的分子致病机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
WANG WX. Pathogenic characteristics of *Streptococcus* suis meningitis isolate and the effect of its 5’-nucleotidaseon virulence [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.

[20] WANG W, LIU J, GUO S, *et al*. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* spp. specific outer membrane proteins by reverse vaccinology and surface proteome [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 625315.

[21] YANG J, ANISHCHENKO I, PARK H, *et al*. Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(3): 1496–1503.

[22] WANG WB, LIU L, GUO SS, *et al*. Recombinant expression and immunogenicity evaluation of a TonB-dependent receptor of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Protein Expression and Purification, 2022, 197: 106111.

[23] 梁夏夏, 袁倩云, 刘蕾, 等. 副溶血性弧菌外膜蛋白 VP1008 和弧菌铁蛋白受体的重组表达及抗体交叉反应[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 144–151.
LAING XX, YUAN QY, LIU L, *et al*. Recombinant expression and antibody cross-reaction of the outer membrane protein VP1008 and ferric vibrioferrin receptor of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 144–151.

[24] 段静留, 温晔, 彭少丹, 等. A、C、Y、W135 群脑膜炎奈瑟菌抗体血清体外杀菌试验方法优化[J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(3): 18–26.
DUAN JL, WEN Y, PENG SD, *et al*. Optimization of serum bactericidal assay for serogroups A, C, YW135 from *Neisseria meningitidis* [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2018, 46(3): 18–26.

[25] LUN J, ZHENG P, LIANG X, *et al*. Identification of a conserved cryptic epitope with cross-immunoreactivity in outer membrane protein K (*OmpK*) from *Vibrio* species [J]. Vaccine, 2025, 53: 126964.

[26] IM K, MARENINOV S, DIAZ MFP, *et al*. An introduction to performing immunofluorescence staining [J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1897: 299–311.

[27] TAMAO Y, NOGUCHI K, SAKAI-TOMITA Y, *et al*. Sequence analysis of *nutA* gene encoding membrane-bound Cl(-)-dependent 5’-nucleotidase of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Biochemistry, 1991, 109(1): 24–29.

[28] JARA-MEDINA NR, CEDEÑO-PINARGOTE AC, BELTRÁN-NOBOA A, *et al*. Managing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* infections in the Whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*): A systematic review [J]. Molecules, 2025, 30(17): 3620.

[29] BESHIRU A, IGBINOSA EO. Surveillance of *Vibrio parahaemolyticus* pathogens recovered from ready-to-eat foods [J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 4186.

[30] NEIL WA, HARD C, BOWERS JC, *et al*. Levels of *Vibrio parahaemolyticus* in pacific *Oysters* (*Crassostrea gigas*) from Washington State following ambient exposure and chilling [J]. Journal of Food Protection, 2023, 86(6): 100092.

[31] SAKAI Y, TODA K, MITANI Y, *et al*. A novel mechanism for utilization of extracellular AMP in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987, 144(1): 382–386.

[32] FAN J, ZHANG Y, CHUANG-SMITH O N, *et al*. Ecto-5’-nucleotidase: A candidate virulence factor in *Streptococcus sanguinis* experimental endocarditis [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38059.

[33] BAKER-AUSTIN C, OLIVER JD, ALAM M, *et al*. *Vibrio* spp. infections [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4(1): 8.

[34] 刘建欣, 刘蕾, 郭珊珊, 等. 副溶血性弧菌外膜蛋白 BamA 重组表达及其免疫原性分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(15): 43–50.
LIU JX, LIU L, GUO SS, *et al*. Recombinant expression and immunogenicity of outer membrane protein BamA of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2022, 50(15): 43–50.

[35] SERRUTO D, BOTTOMLEY MJ, RAM S, *et al*. The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: Immunological, functional and structural characterization of the antigens [J]. Vaccine, 2012, 30(2): B87–B97.

[36] GIUNTINI S, REASON DC, GRANOFF DM. Combined roles of human IgG subclass, alternative complement pathway activation, and epitope density in the bactericidal activity of antibodies to meningococcal factor h binding protein [J]. Infection and Immunity, 2012, 80(1): 187–194.

[37] ACKERMAN ME, BAROUCH DH, ALTER G. Systems serology for evaluation of HIV vaccine trials [J]. Immunological Reviews, 2017, 275(1): 262–270.

(责任编辑: 韩晓红　蔡世佳)