

## 嗜水气单胞菌 HBNUAh01 外膜蛋白 A 基因在烟草叶片细胞中的瞬时表达

张乐祎 孙彩霞 张亚宁 杨俊青 赵宝华\*

河北师范大学生命科学学院 石家庄 050016

**摘要:** 【目的】从嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) HBNUAh01 中克隆外膜蛋白 A (outer membrane protein A, ompA) 基因并在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 叶片细胞中瞬时表达该蛋白。【方法】以嗜水气单胞菌 HBNUAh01 为模板进行嗜水气单胞菌外膜蛋白 A (AhompA) 基因片段的 PCR 扩增,并将其克隆到 pEASY-Blunt Simple 载体中以进行测序。测序正确的 AhompA 基因序列与含有黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP) 基因的表达载体 pCAMBIA1300 构建重组表达载体。将该重组表达载体转化到农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 感受态细胞中,随后用阳性转化子转染烟草叶片细胞。使用激光扫描共聚焦成像系统 (Confocal Laser Scanning Microscope) 检测观察融合表达 AhompA 基因的黄色荧光蛋白并采用 RT-PCR 检测 AhompA 基因在烟草叶片中的转录情况。【结果】从嗜水气单胞菌 HBNUAh01 中克隆出大小为 1032 bp 的 AhompA 基因序列,并在烟草叶片中成功表达 AhompA 和 YFP 的融合蛋白。【结论】AhompA 基因在烟草叶片细胞中的成功表达为进一步研究利用植物疫苗防治嗜水气单胞菌引起的水产动物疾病奠定了基础。

**关键词:** 嗜水气单胞菌, 外膜蛋白, 黄色荧光蛋白, 烟草, 瞬时表达, 植物疫苗

**中图分类号:** S336    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2012) 02-0184-07

气单胞菌属是一类常见于水体环境中的革兰氏阴性菌,是水产养殖中的主要致病菌<sup>[1]</sup>,该属中的嗜水气单胞菌会导致多种水产常见疾病,如多种鱼类的败血病、中华鳖的红脖子病、红底板病、疥疮病等,给水产养殖业造成了严重的经济损失<sup>[2]</sup>。该致病菌的主要致病因子包括外膜蛋白、S 层蛋白、内毒素、外毒素、胞外酶、铁转运蛋白等,其中外膜蛋白可激发机体的细胞免疫和体液免疫应答,具有良好的免疫原性<sup>[3]</sup>。

为防治气单胞菌属引起的水产疾病,目前较有效的办法有疫苗免疫预防、药物治疗和养殖技术改进,其中以疫苗免疫预防最为有效。但由于传统疫苗在制作流程、生产成本、接种方法及安全性等方面存在很多不足,导致其在防治水产疾病的过程中不能有效的发挥作用<sup>[4]</sup>。植物基因工程疫苗是利用植物表达病原菌抗原蛋白的一个或几个亚单位,它没有病原体完整的侵染能力,却可以使机体对特异的病毒或细菌产生免疫应答反应。在可食植物组织

基金项目:河北省科技攻关项目 (06780503)

\* 通信作者。Tel: +86-311-80789712, Fax: +86-311-80789710, E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

作者简介:张乐祎 (1986-) 男,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事水生动物病原微生物学研究。

收稿日期:2011-10-07;修回日期:2011-12-18

中表达的疫苗因可以直接食用,又称为口服疫苗或可食疫苗。当表达疫苗的可食植物的组织被吞咽消化后,抗原被位于小肠黏膜滤泡组织中的膜细胞吞饮后转运到固有层,传递给抗原递呈细胞如巨噬细胞和 B 细胞,再由巨噬细胞等将抗原传递给辅助性 T 细胞,后者产生细胞因子从而活化 B 细胞,产生分泌型抗体 IgA、循环抗体 IgG 和细胞毒性 T 细胞。对胃肠道和非胃肠道传染病包括爱滋病等均可产生免疫保护作用<sup>[5-6]</sup>。植物性可食疫苗因其成本低廉、安全有效、生产及接种方法简单快捷尤其是可以掺入食料中进行饲喂接种等优势,在水产养殖业中具有广阔的前景<sup>[7]</sup>。

为验证嗜水气单胞菌抗原蛋白在植物中表达的可行性,以便为进一步开发嗜水气单胞菌植物性可食疫苗奠定基础,本文利用植物瞬时表达系统进行嗜水气单胞菌外膜蛋白的异源表达,以嗜水气单胞菌 HBNUAh01 外膜蛋白 A 基因进行基因克隆并构建了含有 YFP 标签的重组真核表达载体。通过重组表达载体转化农杆菌并最终侵染烟草叶片组织后,检测到 AhompA 基因和 YFP 基因的融合蛋白在烟草叶片细胞中的瞬时表达。初步证明了嗜水气单胞菌抗原蛋白在植物中表达的可行性,为进一步研究开发抗嗜水气单胞菌植物基因工程疫苗以及使用植物疫苗防治嗜水气单胞菌引起的水产疾病奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 烟草植株、菌株、载体和试剂

嗜水气单胞菌 HBNUAh01 株由本实验室保存;transstartfastPfu 高保真聚合酶、DNA 分子量标准 Trans2K、1 kb DNA Ladder 及 pEASY-Blunt Simple 克隆载体均购自北京全式金生物技术有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒均购自广东盛生物技术公司;经改造过的含有 YFP 标签的 pCAMBIA1300 真核表达载体由本实验室保存;E. coli DH5 $\alpha$  感受态细胞及农杆菌 GV3101 感受态细胞由本实验室制作保存,烟草植株由本实验室培养。

### 1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中嗜水气单胞菌 Ah41 菌株外膜蛋白 A 前体基因(GU196148),利用 Primer Premier 5 软件设计一对特异性引物(AhompA-P1、AhompA-

P2)用于嗜水气单胞菌外膜蛋白 A 基因的扩增,上下游引物 5 端分别添加 Xba I 和 BamH I 酶切位点(下划线部分)和 2 个保护性碱基。由于使用的表达载体为经改造过的含 YFP 标签的 pCAMBIA1300,其上的 CaMV35S 启动子后的第一个 ATG 起始密码子为 YFP 标签基因的 ATG 起始密码子,而构建时所选择的 YFP 基因上游克隆位点 BamH I 的序列位置导致应在克隆的外源基因 3 末端正确读框后多克隆 1 个碱基(该碱基加粗标示)以保证克隆位点后 YFP 基因的读码框正确,因此设计引物如下。引物由上海生工生物技术有限公司合成。上游引物 AhompA-P1: 5'-GCTCTAGAATGATGAAAATGGCTCTTCC-3' (下划线为酶切位点 Xba I);下游引物 AhompA-P2: 5'-GCCGATCCACTTCTGAACTTCTTGTACGC-3' (下划线为酶切位点 BamH I)。

根据 GenBank 中 YFP 基因(DQ835190),利用 Primer Premier 5 软件设计一对特异性引物(YFP-P1、YFP-P2)用于验证重组表达载体在转染烟草叶片后 YFP 基因转录情况的 RT-PCR 检测。引物由上海生工生物技术有限公司合成。上游引物 YFP-P1: 5'-ATGGTGAGCAAGGGCG-3';下游引物 YFP-P2: 5'-TTATCTAGATCCGGTGGATCTG-3'。

### 1.3 PCR 扩增

以嗜水气单胞菌 HBNUAh01 为模板进行菌液 PCR 扩增目的基因。模板的制备:将嗜水气单胞菌 HBNUAh01 用 LB 培养基扩培,取震荡培养过夜的菌液于 12000  $\times$  g 离心 1 min,用 1/10 体积无菌水重悬菌体沉淀,沸水浴 5 min,作为模板。PCR 反应在 50.0  $\mu$ L 体系中进行,双蒸水 28.0  $\mu$ L,5  $\times$  TransStart FastPfu Buffer 10.0  $\mu$ L,dNTP 5.0  $\mu$ L,AhompA-P1 2.0  $\mu$ L,AhompA-P2 2.0  $\mu$ L,DNA 模板 2.0  $\mu$ L,TransStart FastPfu DNA Polymerase 1.0  $\mu$ L,混匀后按下列条件分别进行 PCR 扩增:95 $^{\circ}$ C 2 min 预变性,95 $^{\circ}$ C 20 s,50 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,共进行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

### 1.4 PCR 产物克隆及序列分析

PCR 产物经回收纯化后与 pEASY-Blunt Simple 载体连接,连接体系为 5.0  $\mu$ L,其中 PCR 产物 4.0  $\mu$ L,pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 1.0  $\mu$ L,混匀后于 25 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 即完成克隆载体的连接。连接产物转化 E. coli DH5 $\alpha$  感受态细胞,Xba I 和

*Bam*H I 双酶切鉴定提取重组质粒。经酶切鉴定正确的重组质粒送北京中科希林生物技术有限公司测序,获得的序列应用 DNA MAN 软件进行序列分析及 Blast 序列同源性比较。

### 1.5 AhompA 基因真核表达载体构建

使用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*H I 对重组克隆载体及含有 YFP 标签的 pCAMBIA1300 真核表达载体分别进行双酶切,纯化回收 AhompA 基因片段与双酶切后的含 YFP 标签的 pCAMBIA1300 真核表达载体连接后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。提取重组表达载体进行 PCR 鉴定(AhompA-P1、AhompA-P2 为引物)及 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定。经 PCR 及双酶切鉴定正确的重组表达质粒送北京中科希林生物技术有限公司测序,并进行序列分析。

### 1.6 表达载体转化农杆菌

将测序正确的重组表达质粒经液氮冻融法转化到农杆菌 GV3101 感受态细胞中,用含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 选择培养基筛选抗性菌落,提取表现卡那霉素抗性的农杆菌质粒 DNA,经特异引物 PCR 及 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切 2 种验证无误后,菌液经液氮速冻后于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用,完成农杆菌瞬时转染系统的构建。并以同样的转化方法用只含 YFP 标签的表达载体转化农杆菌 GV3101 感受态细胞,作为对照在后续实验中使用。

### 1.7 AhompA 基因在烟草叶片中的瞬时表达与检测

**1.7.1 激光扫描共聚焦成像系统成像检测:**分别将含 AhompA 基因的重组表达载体农杆菌转化子及只含 YFP 标签的表达载体农杆菌转化子菌株活化,以 2% 的接种量接入含卡那霉素的 LB 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 160 r/min 振荡培养过夜,5000  $\times$  g 离心 10 min 收集菌体,用稀释缓冲液(5 mg/mL D-葡萄糖,9.76 mg/mL MES,0.76 mg/mL Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,0.0196 mg/mL 乙酰丁香酮)洗涤菌体 3 次,以稀释缓冲液将菌体浓度调整至 OD<sub>600</sub> = 0.5。用稀释好的菌悬液注射烟草叶片,并单独以稀释缓冲液注射烟草叶片做阴性对照,光照条件下培养 48 h 后,剪取叶边缘组织在共聚焦成像显微镜下观察拍照。

**1.7.2 RT-PCR 检测:**收集光照培养 48 h 后含 AhompA 基因的重组表达载体农杆菌转化子转染的烟草叶片作为实验组,以只含 YFP 标签的

pCAMBIA1300 质粒农杆菌转化子转染的叶片为阳性对照组,以只注射稀释缓冲液的烟草叶片为阴性对照组,使用总 RNA 抽提试剂盒提取实验组及阳性阴性对照组烟草叶片的总 RNA,并使用 RT-PCR 试剂盒通过 RT-PCR 方法检验 AhompA 基因的 mRNA 在烟草叶片中的转录情况。

## 2 结果

### 2.1 PCR 结果

按照 1.3 的方法扩增得到的产物经 1% 琼脂糖电泳验证,扩增产物在 DNA 分子量标准的 1000 bp 指示带附近出现预期片段。

### 2.2 重组克隆载体质粒双酶切鉴定

将 AhompA 基因片段回收,与 *pEASY-Blunt* Simple 载体连接构建重组克隆载体,重组克隆载体经 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切处理后经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示,在 1 kb DNA Ladder DNA 分子量标准 1000 bp 指示带附近出现预期的目的片段以及在 4000 bp 指示带附近出现预期为 3830 bp 左右的载体片段,确定为阳性重组克隆载体。

### 2.3 AhompA 基因序列分析

测序结果(GenBank 登录号:JN703286)表明,该基因全长 1035 bp,存在唯一开放阅读框,1-1032 位编码 344 个氨基酸。经同源性比较得出,与嗜水气单胞菌 Ah41 菌株外膜蛋白 A 前体基因(登录号为 GU196148)的核苷酸与氨基酸序列的同源性分别为 94.01%、95.63%。

### 2.4 重组表达载体质粒双酶切及 PCR 鉴定

将阳性重组克隆载体和只含 YFP 标签的 pCAMBIA1300 表达载体分别用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切处理后,回收 AhompA 基因片段,与双酶切后的表达载体进行连接以构建重组表达载体。构建的重组表达载体经 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切处理后经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示,在 1 kb DNA Ladder DNA 分子量标准 1000 bp 条带附近出现预期的目的片段以及在大于 10000 bp 条带处出现预期为 11000 bp 左右的载体片段(图 1-A)。以重组表达载体为模板,按照 1.3 的方法进行 PCR 鉴定,得到的产物经 1% 琼脂糖电泳显示,扩增产物的分子量大小约为 1000 bp(图 1-B),与预期值相符,确定为阳性重组表达载体。

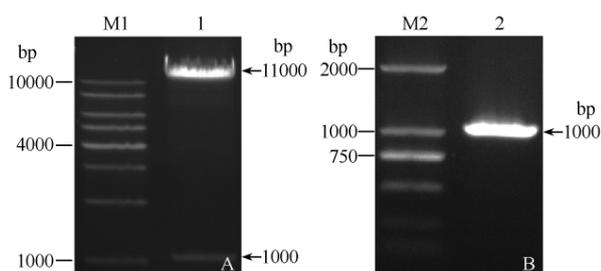


图1 重组表达载体的双酶切鉴定(A)和PCR鉴定(B)  
Fig.1 Restriction enzyme digestion analysis and PCR analysis of recombinant expression vector. A: Restriction enzyme digestion analysis, M1. DNA molecule marker 1 kb DNA Ladder, 1. recombinant expression vector/*Xba* I + *Bam*H I; B: PCR analysis, M2. DNA molecule marker Trans2K, 2. Product of PCR.

## 2.5 AhompA 基因在烟草叶片中的瞬时表达鉴定

2.5.1 激光扫描共聚焦成像系统成像检测:含 AhompA 基因的重组表达载体农杆菌转化子转染的烟草叶片作为实验组,以只含 YFP 标签的 pCAMBIA1300 质粒农杆菌转化子转染的叶片为阳性对照组,以只注射稀释缓冲液的烟草叶片为阴性对照组。激光扫描共聚焦成像系统成像检测结果(图2)显示,实验组、阳性对照组及阴性对照组于光照培养 48 h 后观察融合的荧光蛋白表达情况,实验组及阳性对照组均观察到黄色荧光蛋白表达,但阳性对照组的黄色荧光要明显强于实验组,而阴性对照组无黄色荧光。

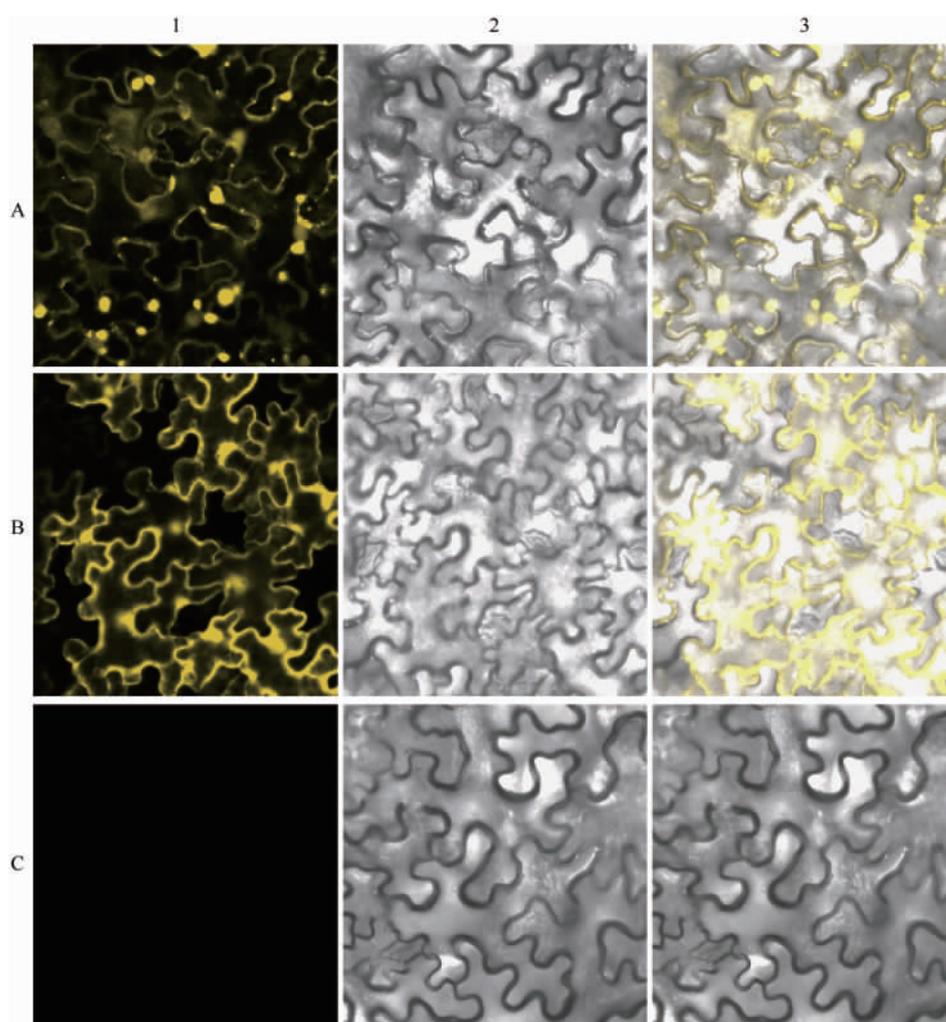


图2 激光共聚焦成像系统观察结果

Fig. 2 Observations by Confocal Laser Scanning Microscope. A: the expression of YFP in experimental group tobacco leaf cell. B: the expression of YFP in positive control group tobacco leaf cell. C: the expression of YFP in negative control group tobacco leaf cell. 1. YFP fluorescence, 2. bright field, 3. merge.

**2.5.2 RT-PCR 检测:**以引物 YFP-P1 和 YFP-P2 对上述 3 组不同的烟草叶片进行 RT-PCR 的结果(图 3)显示,实验组转录 YFP 基因,阳性对照组同样转录 YFP 基因,而阴性对照组不转录 YFP 基因,表明构建的含 AhompA 基因的重组表达载体及只含 YFP 标签的 pCAMBIA1300 表达载体在烟草叶片细胞中成功转录 YFP 基因,该结果同 2.5.1 激光扫描共聚焦成像系统成像检测的结果相符。以引物 AhompA-P1 和 AhompA-P2 对上述 3 组不同的烟草叶片进行 RT-PCR 的结果(图 4)显示,重组表达载体转染的烟草叶片细胞转录 AhompA 基因,而只含 YFP 标签的 pCAMBIA1300 质粒转染的烟草叶片细胞和只注射

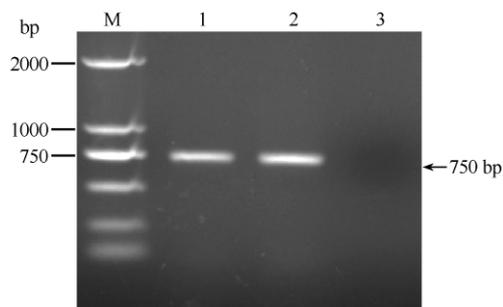


图 3 RT-PCR 检测烟草叶片细胞中 YFP 基因的转录

Fig. 3 Identification of YFP transcription in tobacco leaf cell by RT-PCR. M. DNA molecule marker Trans2K, 1. RT-PCR Product of experimental group, 2. RT-PCR Product of positive control group, 3. RT-PCR Product of negative control group.

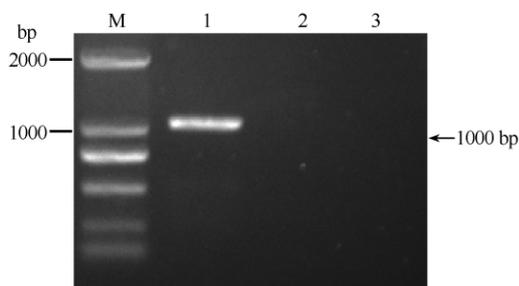


图 4 RT-PCR 检测烟草叶片细胞中 AhompA 基因的转录

Fig. 4 Identification of AhompA transcription in tobacco leaf cell by RT-PCR. M. DNA molecule marker Trans2K, 1. RT-PCR Product of experimental group, 2. RT-PCR Product of tobacco leaf cell with plasmid pCAMBIA1300 carrying YFP gene only, 3. RT-PCR Product of negative control group with dilution Solution.

稀释缓冲液的阴性对照组不转录 AhompA 基因,表明构建的含 AhompA 基因的重组表达载体在烟草叶片细胞中成功转录 AhompA 基因。

### 3 讨论

本研究在烟草叶片中利用植物瞬时表达系统及荧光蛋白融合表达技术,快速可靠的验证了嗜水气单胞菌 HBNUAh01 外膜蛋白 A 在烟草中的成功表达,这是国内外首次在植物中成功表达嗜水气单胞菌抗原蛋白。本研究使用的表达载体为经过本实验室改造过的 pCAMBIA1300 植物表达载体,改造时在原始载体内加入了 CaMV35S 强启动子和 YFP 标签,可引入外源基因的多克隆位点位于 CaMV35S 强启动子下游 YFP 标签上游,因此在本研究所构建的重组表达载体中,AhompA 基因位于 CaMV35S 强启动子与 YFP 标签之间,即实现了 AhompA 基因和 YFP 基因的融合表达。

植物瞬时表达系统在启动子分析、基因功能分析和生产重组蛋白方面用途广泛。并且具有如下优点:1. 简单快速。转化基因可在转化的一周内进行分析,避免了组织培养等繁杂过程;2. 表达水平高且安全有效,不受植物生长发育过程的影响,不产生可遗传的后代,结果可靠直观,被国内外学者广泛采用进行外源蛋白表达的研究,如:Yutaka 等<sup>[8]</sup>在烟草叶片中成功瞬时表达了多聚  $\gamma$  谷氨酸合成酶复合体,Valentine 等<sup>[9]</sup>利用莴苣瞬时表达外源抗体成功,Jing 等<sup>[10]</sup>在莴苣中瞬时表达出有活性的人干扰素  $\beta$ ,吴拥军等<sup>[11]</sup>同样在生菜中瞬时表达鸡干扰素  $\gamma$  成功,此外丁玉梅<sup>[12]</sup>等利用自己构建的质粒在马铃薯中成功瞬时表达了绿色荧光蛋白。

荧光蛋白具有检测便捷、无种属特异性、易于和目的基因融合表达及安全可靠等诸多独特的优点,因此被广泛应用于目的基因的转染及表达的检验<sup>[13]</sup>;烟草作为一种常用的模式生物具有生长周期短、培植简单、便于实验操作等优点,有利于分子克隆及分子遗传的研究。

利用植物瞬时表达系统及荧光蛋白融合表达技

术在烟草中表达嗜水气单胞菌外膜蛋白 A 的成功验证了嗜水气单胞菌外膜蛋白 A 在植物中进行异源表达的可行性,为进一步开发研究抗嗜水气单胞菌植物性可食疫苗奠定了基础。在今后的工作中可深入研究嗜水气单胞菌外膜蛋白 A 在可食植物中的稳定遗传,将获得的稳定遗传可食植物转化子进行组织培养进而获得具有可以稳定表达嗜水气单胞菌外膜蛋白 A 的整个植株,并对其表达的作为抗原的嗜水气单胞菌外膜蛋白 A 进行免疫效价检测。许多相关报道指出水产饲料中使用植物性成分具有多种优点,因此后续试验可继续研究筛选最理想的可食用植物遗传宿主以便用于水产饲料加工,最终达到利用植物性可食疫苗防治嗜水气单胞菌引起的水产疾病的效果。

## 参考文献

- [1] 张玉芬,亢喜刚,张秀军. 嗜水气单胞菌研究进展. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agricultural Science*), 2009, 37 (26): 12389-12390.
- [2] 吴会民,林文辉,石存斌. 嗜水气单胞菌研究概述. 河北渔业 (*Hebei Fisheries*), 2007, 3: 7-11.
- [3] Vivekanandhana G, Hathab A A M, Lakshmanaperumalsamy P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore. *South India Food Microbiology*, 2005, 22: 133-137.
- [4] 贾永红,孙艳香. 转基因植物疫苗研究现状. 廊坊师范学院学报(自然科学版) (*Journal of Langfang Teachers College (Natural Science Edition)*), 2009, 2 (9): 62-64.
- [5] Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH. Immunogenicity of a plant-derived edible chimeric EspA, Intimin and Tir of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Plant Science*, 2011, 180: 620-627.
- [6] Schillberg S, Twyman RM, Fischer R. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. *Vaccine*, 2005, 23: 1764-1769.
- [7] 孟思妤,孟长明,陈昌福. 免疫学技术在水产养殖业中的应用——植物疫苗(上). 渔业致富指南 (*Fishery Guide to be Rich*), 2009, 13: 64-65.
- [8] Negrouk V, Eisner G, Lee HI, Han KP, Taylor D, Wong HC. Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce. *Plant Science*, 2005, 169: 433-438.
- [9] Tarui Y, Iida H, Ono E, Miki W, Hirasawa E, Fujita KI, Tanaka T, Taniguchi M. Biosynthesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid in plants: Transient expression of poly- $\gamma$ -glutamate synthetase complex in tobacco leaves. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(4): 443-448.
- [10] Li J, Chen M, Liu XW, Zhang HC, Shen FF, Wang GP. Transient expression of an active human interferon- $\beta$  in lettuce. *Scientia Horticulturae*, 2007, 112: 258-265.
- [11] 吴拥军,赵德刚,宋莉,许文钊. ChIFN- $\gamma$  基因植物表达载体的构建与瞬时表达. 云南大学学报(自然科学版) (*Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)*), 2008, 30 (6): 630-635.
- [12] 丁玉梅,杨正安,周晓罡,张绍松,孙茂林. 马铃薯质体表达载体构建及 GFP 基因在块茎中的瞬时表达. 作物学报 (*Acta Agronomica Sinica*), 2008, 34 (6): 978-983.
- [13] Peckham GD, Bugos RC, Su WW. Purification of GFP fusion proteins from transgenic plant cell cultures. *Protein Expression and Purification*, 2006, 49: 183-189.

# Transient expression of *Aeromonas hydrophila* HBNUAh01 outer membraneprotein A gene in tobacco leaf cells

Leyi Zhang , Caixia Sun , Yaning Zhang , Junqing Yang , Baohua Zhao\*  
(College of Life Science , Hebei Normal University , Shijiazhuang 050016 , China)

**Abstract:** [Objective] To clone outer membrane protein A (ompA) gene from *Aeromonas hydrophila* HBNUAh01 and transiently express this protein in tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf cells. [Methods] *A. hydrophila* outer membrane protein A (AhompA) gene was amplified by PCR using *A. hydrophila* HBNUAh01 cells as template , and cloned into the pEASY-Blunt Simple vector for sequencing. After sequence confirmation , AhompA gene was inserted into expression vector pCAMBIA1300 containing a yellow fluorescent protein (YFP) gene , to obtain a recombinant expression plasmid. The recombinant expression plasmid was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 competent cells , and the positive clones were transfected to tobacco leaf cells. The expression of yellow fluorescent protein fused with AhompA was observed by Confocal Laser Scanning Microscope , and the mRNA of AhompA was detected by RT-PCR. [Results] The AhompA gene cloned from *A. hydrophila* HBNUAh01 was 1032 bp. The fusion protein of AhompA and YFP was successfully expressed in tobacco leaf cells. [Conclusion] The successful expression of the AhompA gene in tobacco leaf cells has laid a foundation for further investigation of prevention of limnobios diseases caused by *A. hydrophila* with plant vaccine.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila* , outer membrane protein , yellow fluorescent protein , tobacco , transient expression , plant vaccine

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Provincial Programs for Scientific and Technological Research of Hebei(06780503)

\* Corresponding author. Tel: +86-311-80789712; Fax: +86-311-80789710; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

Received: 7 October 2011/Revised: 18 December 2011

## 科学出版社新书推介(2011年9、10月)



### 田波病毒学文选

田波 著;978-7-03-032260-9;定价:288;开本:A4

内容简介:本书由迄今为止田波院士发表的两百多篇论文中选取一百二十七篇集结出版,收载了田波院士在亚病毒、植物病毒、医学与动物病毒研究方面几十年来最重要、最具代表性的论文,展现了田波院士在病毒学各个分支领域取得的非凡成就,同时也反映了我国在上述研究领域的创新成果。

本书可供病毒学相关领域的科学研究工作者和高等院校有关专业的师生参考。

获取更多图书信息请您关注

<http://books.lifescience.com.cn/>

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

联系人:科学出版社科学销售中心 周文宇;电话:010-64017301;E-mail:zhouwenyu@mail.sciencep.com

网上订购:<http://shop.sciencepress.cn/>;卓越网;当当网

联系我们:010-64012501;email:lifescience@mail.sciencep.com

更多精彩图书请登陆网站 欢迎致电索要书目