

杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种胞外产物毒性及免疫原性分析

杨嘉龙 周丽* 战文斌

(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 青岛 266003)

摘要 用玻璃纸平板法提取了杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 *Aeromonas salmonicida masoucida* 的胞外产物(ECP)。毒性试验证实, ECP对剑尾鱼 *Xiphophorus helleri* 具有致死性, 其半致死量(LD₅₀)为4.72 μg 蛋白/g 体重。SDS-PAGE表明, ECP由13条蛋白带组成。利用大鼠抗ECP血清进行的Western-blot印迹显示, 组成ECP的13条蛋白带中有7条具有免疫原性, 能够引发机体的免疫应答反应产生抗体, 其分子量分别为88、70、42、39、36、22和15 kDa。

关键词 杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 胞外产物 毒性 免疫原性

中图分类号 Q176; S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)03-0020-05

Analysis of virulence and immunogenicity of the extracellular products (ECP) extract from *Aeromonas salmonicida masoucida*

YANG Jia-long ZHOU Li* ZHAN Wen-bin

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT The extracellular products (ECP) of *Aeromonas salmonicida masoucida* was extracted by using cellophane plate technique. It was proved to be lethal to swordtail fish (*Xiphophorus helleri*), and the LD₅₀ does was 4.72 g protein/g. The ECP was analyzed by SDS-PAGE and thirteen proteins were observed. Western-blot with rat's antiserum against ECP showed that seven proteins among those thirteen proteins, whose molecular weight were 88, 70, 42, 39, 36, 22 and 15 kDa, respectively, were considered to have immunogenicity and could activate the immunoreaction of the hosts to secrete antibody.

KEY WORDS *Aeromonas salmonicida masoucida* Extracellular products (ECP)
Virulence Immunogenicity

杀鲑气单胞菌 *Aeromonas salmonicida* 为革兰氏阴性杆菌, 分布广泛, 能够引发多种水产动物的疾病, 是一种致病力较强的水产病原菌。它不仅可引起多种鱼类皮肤溃疡病 (McCarthy *et al.* 1975; Austi *et al.* 1987; Kitao *et al.* 1984; 张晓君等 2005), 还可以侵染棘皮动物海胆 *Strongylocentrotus rotundus* (Gilles *et al.*

国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA100306)、国家自然科学基金项目(30271016)、中国海洋大学资助项目(1400-813764)和教育部海水养殖重点实验室开放基金(200212)共同资助

* 通讯作者。E-mail: zhouli@ouc.edu.cn Tel: (0532) 82032284

收稿日期: 2008-04-15; 接受日期: 2008-05-14

作者简介: 杨嘉龙(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产病害与免疫学研究。E-mail: jlyang1220@gmail.com

1986)和刺参 *Apostichopus japonicus* (杨嘉龙等 2007),并引发疾病,造成巨大的经济损失。

胞外产物(Extracellular products, ECP)是细菌在生长过程中不断分泌到体外的、具有生物活性的蛋白酶类及毒素类物质,能够引发宿主的疾病,不同细菌所产生的胞外产物亦不同。Gudmundsdóttir 等(2001)报道,杀鲑气单胞菌无色亚种(*A. salmonicida* ssp. *achromogenes*)的胞外产物对小鼠具有毒性;Mo 等(2002)发现鳗弧菌胞外产物对牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 具有强致病性;迟钝爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* 的胞外产物也具有细胞毒性和动物致病性(葛 艳等 2000)。杀鲑气单胞菌的胞外产物具有良好的免疫原性,能够引发宿主的免疫应答反应,是一种有效的保护性抗原(Wagner *et al.* 2001)。本研究在确定杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 *Aeromonas salmonicida masoucida* 胞外产物对刺参的致病性及生物学特性的前期工作基础上(杨嘉龙等 2007),对其毒性、蛋白组成以及免疫原性做了进一步的研究分析,以其为杀鲑气单胞菌胞外产物亚单位疫苗的研制与开发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株 H1,杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种,分离自患溃疡病刺参(杨嘉龙等 2007),由本实验室分离保存;健康剑尾鱼(平均体重 3.5g),购于青岛市南山市场;健康大鼠,由青岛市药品检验所提供。

1.2 胞外产物(ECP)的制备

用玻璃纸平板法(Inamura *et al.* 1984)制备 ECP。具体流程为:将菌株 H1 接种于营养琼脂液体培养基,25℃摇床培养 24 h,取 0.2 ml 液体培养物涂布于预先放置 1 层玻璃纸的营养琼脂平板上,25℃培养 24 h。每平板用 3 ml 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L pH 7.4)洗下菌体,收集菌悬液于 4℃ 7 000 g 离心 30 min,上清经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后,加入硫酸铵盐析,使硫酸铵终浓度为 2.0 mol/L,室温搅拌 1h,4℃沉降过夜,4℃、10 000g 离心 1h 取沉淀,适量 PBS(0.01mol/L pH 7.4)重悬沉淀并以 PBS 在 4℃透析 24h,每 6h 更换 1 次 PBS,透析袋内即为 ECP 提取物。

1.3 ECP 的毒性试验

以牛血清白蛋白(BSA)为标准,采用考马斯亮蓝染色法(李建武等 1994)测定 ECP 中蛋白含量。以 PBS 对 ECP 进行系列稀释。

以剑尾鱼为实验动物测定 ECP 的毒性。设 4 个 ECP 浓度组和 1 个生理盐水对照组,每组 10 尾剑尾鱼(平均体重 3.5g),每尾剑尾鱼以腹腔注射的方式注射 0.02ml ECP 稀释液,记录剑尾鱼存活情况,用改进的寇氏法(邹玉霞等 2004)计算半数致死量。

1.4 抗 ECP 血清的制备与纯化

将 ECP 于 80℃孵育 30 min 灭活(杨嘉龙等 2007),去离子水透析 24 h 后真空冻干机冻干浓缩,免疫大鼠。基础免疫为 ECP 与弗氏完全佐剂 1:1 混匀,采用背部皮下 6 点注射,每点注射 0.1ml;14d 后加强免疫,ECP 与弗氏不完全佐剂 1:1 混匀,注射方法同基础免疫;21 d 后第 2 次加强免疫,采用尾静脉注射的方法,注射 ECP 0.2 ml,无佐剂;最后一次免疫后的第 7 天,心脏采血,室温倾斜放置 2 h 后,转入 4℃过夜,离心(10 000 g,30 min,4℃),取得抗血清,-80℃保存备用。同时取未免疫的阴性血清备用。

采用辛酸和硫酸铵两步沉淀法从血清中纯化 IgG(周先碗等 2002),具体过程如下:抗血清用 4 倍体积乙酸-乙酸钠缓冲液(0.06 mol/L,pH 4.0)稀释,NaOH 调 pH 为 4.5;室温下滴加辛酸(25 ml/L 血清稀释液),同时缓慢搅拌,然后 4℃、10 000 g 离心 30 min;收集上清,加入 10 倍体积 0.1 mol/L PBS 缓冲液,NaOH 调 pH 值为 7.4;计算溶液总体积,按 313 g/L 加入硫酸铵粉末,同时缓慢搅拌,防止出现沉淀,4℃静置过夜;次日 4℃、5 000 g 离心 20 min,沉淀用少量透析液(0.01 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$,0.015 1mol/L NaCl,pH 7.2)

溶解,4℃透析12 h后,5 000 g离心20 min,吸出上清,即为纯化的抗体,于-80℃保存备用。

1.5 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

试验采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳。将ECP与电泳样品缓冲液等体积混匀,煮沸5 min,冷却后加样,每孔加12 μl样品,并加Marker(Sigma)。采用Tris-甘氨酸(Gly)电泳缓冲液,4℃条件电泳。丙烯酰胺浓度:分离胶10%(v/v),浓缩胶为75%(v/v)。浓缩胶恒定电流为30 mA,分离胶恒定电流为60 mA。电泳结束后,凝胶经考马斯亮蓝(CBB)R250(Sigma)染色后用全自动凝胶成像系统扫描,Gel-Pro Analyzer软件分析各蛋白的分子量。

1.6 Western-blot 印迹

ECP经SDS-PAGE分离后用Mini-Protean cell系统(Bio-rad)转移到孔径为0.45 μm的硝酸纤维素膜上,恒流200 mA通电5 h,4℃。转移结束后,将膜置于5%脱脂奶粉中,4℃过夜封闭,膜在PBST(PBS含0.5%的Tween20)中洗涤3次,每次5 min(下同)。将膜浸于1:500(v/v)大鼠抗ECP血清中,37℃孵育1 h,PBST洗涤。再将膜浸于1:1 000(v/v)碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG中,37℃孵育1 h,PBST洗涤。将膜于含有66 μl氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、33 μl5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸(BCIP)的10 ml NBT/BCIP缓冲液中发色20~30 min。去离子水洗涤,以中止反应。

2 结果

2.1 ECP 毒性试验

ECP对剑尾鱼的毒性试验结果见表1。当注射每尾鱼的蛋白含量分别为40.64、20.32和10.16 μg时,48 h内剑尾鱼的死亡率分别为100%、60%和20%,死亡的剑尾鱼注射处肌肉溶解;注射等量0.85%生理盐水的对照组没有出现死亡。

按改进的寇氏法计算ECP对剑尾鱼的半致死量 $LD_{50}=4.72 \mu\text{g}$ 蛋白/g体重。

表1 ECP对剑尾鱼的毒性实验

Table 1 Toxicity experiment of ECP to *Xiphophorus helleri*

分组 Group	蛋白浓度(mg/ml) Protein concentration	剂量(ml) Dose	实验数(尾) Test No	死亡数(尾) Death No	死亡率(%) Mortality
1	2.032	0.02	10	10	100
2	1.016	0.02	10	6	60
3	0.508	0.02	10	2	20
4	0.254	0.02	10	0	0
对照 Control	0.85% NaCl	0.02	10	0	0

2.2 SDS-PAGE 图谱

ECP的SDS-PAGE(图1)显示,组成ECP的蛋白大约有13条蛋白带,多数蛋白集中在30~100 kDa,其中主要条带有9条,分子量分别为88、70、42、39、36、31、22、18和15 kDa,另有4条不太明显的蛋白带100、48、35和23 kDa。

2.3 Western-blot 印迹

ECP的Western-blot图谱(图1)显示,ECP的免疫反应发色条带主要有7条,分子量分别为88、70、42、

39、36、22 和 15 kDa。说明在 ECP 的 13 条蛋白中只有 7 条蛋白带具有较强的免疫原性,能够激发大鼠的免疫应答反应而产生抗体,其他 6 条蛋白带的免疫原性弱或无。

3 讨论

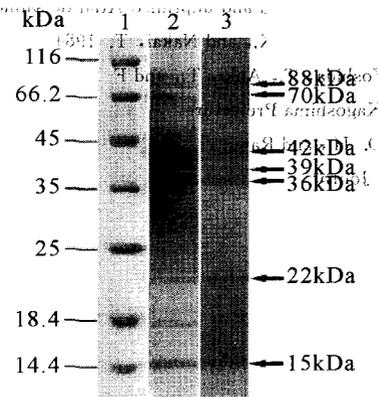
在早期的研究中发现,菌株 H1 的胞外产物具有多种蛋白酶活性和溶血活性,且这些活性物质对刺参具有致病性(杨嘉龙等 2007),而在本研究中发现,该胞外产物对剑尾鱼也具有致死性。因此,推测该胞外产物的毒性对水产动物可能具有普适性。胞外产物中具有生物活性的物质,如蛋白酶和溶血素等是胞外产物的主要致病成分。蛋白酶可以降解宿主的组织结构蛋白,造成广泛的组织损伤,从而有利于细菌突破宿主的防线并在体内扩散,并能增强逃避宿主体内免疫机制的能力等(陈师勇等 2002);溶血素可以溶解动物血液中的红细胞,从而对动物造成损伤,红细胞溶解后释放的血红蛋白为细菌提供营养物质(雷祚荣 1993)。ECP 对剑尾鱼的 LD₅₀ 为 4.72 μg 蛋白/g 体重,由于 ECP 为硫酸铵粗提产物,尚未进行毒力因子的分离纯化,故其毒性相对于纯化的毒素为弱。

细菌分泌到胞外的蛋白一般具有复杂的结构。莫照兰(2001)从鳗弧菌 *Vibrio anguillarum* 中提取的胞外产物蛋白经 SDS-PAGE 显示至少具有 14 条蛋白带。本研究从杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种中分离出的胞外产物由分子量不同的 13 种蛋白组成,分子量为 42 kDa 和 36 kDa 的两条为其主要蛋白,进一步的分离纯化与致病性分析证明 42 kDa 的蛋白为一种丝氨酸蛋白酶,是菌株 H1 的毒力因子(Yang *et al.* 2008)。

细菌侵染宿主后向胞外分泌蛋白酶及溶血素等具有活性的胞外产物而使宿主致病,而机体则通过免疫应答反应产生相应的抗体对机体进行保护,因此胞外产物是一种有效的保护性抗原,是制备亚单位疫苗的理想材料。莫照兰(2001)制备的鳗弧菌的菌细胞-胞外产物联合疫苗对牙鲆的免疫保护力为 44%,比单纯的全菌疫苗的免疫保护力高 12%。本研究利用大鼠抗 ECP 血清对 ECP 进行 Western-blot 分析,发现 13 条 ECP 蛋白中只有 7 条蛋白具有免疫原性,能够引发机体的免疫应答反应产生抗体,其他 6 条蛋白免疫原性无或弱,无法引发机体的免疫应答,这可能与蛋白质的高级结构与空间构象改变而导致的抗原性变化有关。杀鲑气单胞菌胞外产物免疫原性的确定为其胞外产物亚单位疫苗的研制与开发、水产动物杀鲑气单胞菌疾病的疫苗防治奠定了理论基础。

参 考 文 献

- 李建武, 萧能庆, 余瑞元. 1994. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社
- 邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 刘 婷, 徐永立. 2004. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定. 高技术通讯, 4: 89~93
- 陈师勇, 莫照兰, 张振冬, 徐永立, 张培军. 2002. 鳗弧菌胞外产物中致病因子的分离纯化及性质研究. 高技术通讯, 08: 96~100
- 周先碗, 胡晓倩. 2002. 生物化学仪器分析与实验技术. 北京: 化学出版社
- 张晓君, 房 海, 陈翠珍, 战文斌. 2005. 石鲈 *Kareius bicoloratus* L. 源杀鲑气单胞菌杀鲑亚种生物学性状的研究. 海洋与湖沼, 36(1): 51~60
- 杨嘉龙, 周 丽, 邢 婧, 绳秀珍, 战文斌. 2007. 养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析. 中国水产科学, 14(6): 981~989
- 莫照兰. 2001. 养殖牙鲆细菌性疾病调查及鳗弧菌致病性研究. 见: 中国科学院海洋研究所博士后研究报告, 80~100
- 葛 艳, 陈怀青, 陆承平. 2000. 迟钝爱德华氏菌胞外产物的细胞毒性和动物致病性. 中国兽医学报, 20(1): 34~37
- 雷祚荣. 1993. 细菌毒素分子生物学. 北京: 中国科学技术出版社
- Austin, B., and Austin, D. A. 1987. Bacterial fish pathogens; Disease of farmed and wild fish. Chichester: Ellis Horwood Limited, 262~295
- Gilles, K. W., and Pearse, J. S. 1986. Disease in sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus*; experimental infection and bacterial virulence. Dis.



1-Marker; 2-ECP(SDS-PAGE); 3-ECP(Western-blot)

图1 H1-ECP 的 SDS-PAGE

图谱与 Western-blot 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE and Western-blot of H1-ECP

- aquat. Org. 1: 105~114
- Gudmundsdóttir, S., Magnadóttir, B., and Gudmundsdóttir, B. K. 1995. Effects of antigens from *Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes* on leukocytes from primed and unprimed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Shell. Immunol. 5: 493~504
- Inamura, H., Muroga, K., and Nakai, T. 1984. Toxicity of extracellular products of *V. anguillarum*. Fish Pathol. 19(2): 89~96
- Kitao, T., Yoshida, T., Aoki, T., and Fukudome, M. 1984. Atypical *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of an ulcer disease of eel occurred in Kagoshima Prefecture. Fish Pathology, 19: 113~117
- McCarthy, D. H., and Rawle, C. T. 1975. Rapid serological diagnosis of fish furunculosis caused by smooth and rough strains of *Aeromonas salmonicida*. Journal of General Microbiology, 86: 185~187
- Mo, Z. L., Chen, S. Y., and Zhang, P. J. 2002. Properties of proteolytic toxin of *Vibrio anguillarum* from diseased flounder. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 20(4): 316~322
- Wagner, U., Hadge, D., and Gudmundsdóttir, B. K. 2001. Antibody response in salmonids against the 70 kDa serine protease of *Aeromonas salmonicida* studied by a monoclonal antibody-based ELISA. Vet. Immunol. Immunop. 82: 121~135
- Yang, J. L., Zhan, W. B., Zhou, L., and Xing, J. 2008. Purification, virulence and characterization of an extracellular peptidase produced by *Aeromonas salmonicida* spp. *masoucida* isolated from cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Dis. Aquat. Org. 82: 223~229

《海洋水产研究》期刊于2009年1月起更名为《渔业科学进展》

各有关单位、各位读者：

经国家新闻出版署2008年11月13日(新出报刊[2008]1324号文)和山东省新闻出版局2008年12月11日(鲁新出批字[2008]325号文)批准,从2009年1月起,《海洋水产研究》期刊更名为《渔业科学进展》(英文名:Progress in Fishery Sciences),ISSN 1000-7075,国内统一刊号:CN 37-1466/S,国内邮发代号:24-153,国外发行代号:4578Q。刊期仍为双月刊。

更名后,本刊栏目包括研究论文、研究综述和研究简报等,内容涵盖各类水域渔业科学研究最新成果,涉及与渔业科技有关的各学科门类的研究进展。本刊主要报道渔业生物学、渔业海洋学、水产增养殖学、水产种质资源与遗传育种、水生野生生物保护、渔业生物病害及其防治、渔业生态环境保护、渔业设施与捕捞技术、渔业装备制造技术、水产品综合利用与质量安全等领域的新发现、新技术和新成果。希望各位领导、各位专家,一如既往地关心和支持我们的工作,踊跃为《渔业科学进展》刊物投稿。

祝愿各位领导、各位专家工作顺利、万事如意!

中国水产科学研究院黄海水产研究所

《渔业科学进展》编辑部

2009年3月30日