

不同海洋弧菌中5类溶血素基因的分布及其与溶血活性和磷脂酶活性的相关性

王淑娴, 张晓华, 孙铂光, 陈吉祥

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:用57株海洋弧菌,包括26株弧菌标准菌株、20株哈维氏弧菌、11株副溶血弧菌(从不同宿主和不同地理环境中分离得到),用PCR法合成5类相应的地高辛标记的溶血素基因探针,利用其进行Southern Blot,检测这5类溶血素基因在57株弧菌中的分布。结果显示,在57海洋株弧菌中,含有TDH、HlyA、TLH、 δ -VPH和HLX溶血素基因的菌株分别为2株、2株、49株、3株和30株。另外,1株霍氏格里蒙菌(*Grimontia hollisae*)和1株副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)中分别含有2个TDH溶血素基因。用鱼血平板和卵磷脂平板检测57株弧菌的溶血活性和磷脂酶活性,结果表明,弧菌溶血活性和磷脂酶活性与TLH溶血素基因具有显著相关性,与另外4类溶血素基因的关系不明显。[中国水产科学,2007,14(4):570-578]

关键词:弧菌;溶血素基因;溶血活性;磷脂酶活性

中图分类号:S941

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)04-0570-09

弧菌是海洋环境中最常见的细菌类群之一,广泛分布于近岸及河口海水、海洋生物的体表和肠道中,是海水和许多海洋生物的正常或有益菌群成员。研究发现,许多海洋弧菌是养殖虾类和鱼类的重要病原菌^[1-3]。溶血素是病原弧菌中分布最为广泛的毒素之一,能够导致红细胞膜的破裂并伴随着血红蛋白的释放。某些细菌的溶血作用是由其产生的酶活性引起,如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的磷脂酶C和美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)的磷脂酶D,而另一些细菌的溶血素是通过在红细胞膜上形成小孔而产生溶血作用^[4-6]。有时溶血素的穿孔能力不仅仅局限于红细胞,还可以作用于多种其他类型的细胞,如肥大细胞和嗜中性粒细胞等,通过引起组织损伤而增加其毒性^[4,6-7]。

尽管弧菌属细菌产生的各种溶血素均具有溶血活性,但它们的核苷酸序列、预测的氨基酸序列、活性以及作用机理却不尽相同。目前发现5类有代表性的溶血素家族,即副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的热稳定性直接溶血素(TDH)、霍乱弧菌(*V. cholerae*)的El Tor溶血素(HlyA)、副溶血弧菌的热不稳定性溶血素(TLH)、副溶血弧菌的热

稳定性溶血素(δ -VPH)以及霍乱弧菌O1的一种溶血素(HLX)^[8]。迄今,对前2类溶血素的研究较为深入,并且证明其确实与致病性相关。然而,对其他溶血素,如TLH、 δ -VPH和HLX的了解却不多,需要更深入的研究。本研究拟检测海洋弧菌中5类溶血素基因的分布及其与弧菌的溶血活性和磷脂酶活性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

5类溶血素基因序列从GenBank中获取,57株海洋弧菌包括26株弧菌标准菌株,20株哈维氏弧菌和11株副溶血弧菌(从不同宿主和不同地理环境中分离得到,见表1)。SF1是本实验室从青岛某养殖场发病的鲈鱼(*Lateolabax japonicus*)中分离得到,其余菌株由英国Heriot-Watt大学生物学系提供。所有菌株都已按《Bergey's细菌学系统手册》(第2版)^[9]进行过鉴定。实验菌株用2216E培养基于28℃过夜培养,每7~14d传代培养1次。采取大菱鲆红细胞用于配置鱼血平板,用蛋黄配置卵磷脂平板。

收稿日期:2006-10-13; 修订日期:2007-03-15.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371119);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0645)资助项目.

作者简介:王淑娴(1982-),女,硕士研究生,研究方向为海洋微生物学. E-mail: wangshuxian_2000@163.com

通讯作者:张晓华. E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

表1 本研究所用弧菌菌株
Tab.1 *Vibrio* strains in this study

菌株号 Strain code	种名 Species	菌株或来源 Strain or source	国家(分离时间) Country (year of isolation)
VIB 314	霍氏格里蒙菌 <i>Grimontia hollisae</i>	LMG17719 ^T	USA
VIB 289	美人鱼发光杆菌 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	LMG 7892 ^T	USA
VIB 288	肋生盐弧菌 <i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i>	LMG 6460 ^T	Australia
VIB 72	鳗弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	LMG 4437 ^T	Norway
VIB 281	河口弧菌 <i>V. aestuarianus</i>	LMG 7909 ^T	USA
VIB 283	溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	LMG 4408 ^T	
VIB 284	溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	LMG 4409 ^T	Japan
VIB 285	坎贝氏弧菌 <i>V. campbellii</i>	LMG 11216 ^T	USA
VIB 286	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	LMG 7890 ^T	USA (1982)
VIB 287	辛辛那提弧菌 <i>V. cincinnatiensis</i>	LMG 7891 ^T	USA
VIB 290	双氮养弧菌 <i>V. diazotrophicus</i>	LMG 7893 ^T	Canada
VIB 291	费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>	LMG 4414 ^T	USA (1933)
VIB 292	河弧菌 <i>V. fluvialis</i>	LMG 7894 ^T	Bangladesh
VIB 293	弗尼斯弧菌 <i>V. furnissii</i>	LMG 7910 ^T	
VIB 294	产气弧菌 <i>V. gazogenes</i>	LMG 13541 ^T	USA
VIB 295	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	LMG 4044 ^T	USA (1935)
VIB 296	地中海弧菌 <i>V. mediterranei</i>	LMG 11258 ^T	Spain
VIB 298	拟态弧菌 <i>V. mimicus</i>	LMG 7896 ^T	
VIB 299	飘浮弧菌 <i>V. natriegens</i>	LMG 7896 ^T	USA
VIB 301	沙蚕弧菌 <i>V. nereis</i>	LMG 13543 ^T	USA
VIB 304	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	LMG 2850 ^T	
VIB 305	远洋弧菌 <i>V. pelagia</i>	LMG 3897 ^T	USA
VIB 306	解蛋白弧菌 <i>V. proteolyticus</i>	LMG 3772 ^T	USA
VIB 309	塔氏弧菌 <i>V. tubiashii</i>	LMG 10936 ^T	
VIB 310	创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	LMG 13545 ^T	
VIB 414	火神弧菌 <i>V. logei</i>	LMG19806 ^T	USA
VIB 351	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Shark	Bahamas
VIB 391	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Shrimp	Thailand (1990)
VIB 395	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	LMG11225	
VIB 400	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	LMG 11659	
VIB 410	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	ATCC 14126	
VIB 571	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea bass Spain (1990)	
VIB 572	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea bream	Spain (1990)
VIB 642	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea bream	Spain (1990)
VIB 645	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea bass	Tunisia (1993)
VIB 646	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Shark tank water	Denmark (1993)
VIB 647	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea bream	Greece (1992)
VIB 648	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Shark liver	Denmark
VIB 649	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea bream	Malta (1993)
VIB 651	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Shark tank water	Denmark (1994)
VIB 652	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea bass	Italy
VIB 653	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea bass	Turkey
VIB 658	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea bream	France (1990)
VIB 659	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea bass	Tunisia
SF1	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Sea perch	China (2002)
VBA 642	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	Prawn	Australia
VIB 457	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	LMG 12093	
VIB 458	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	LMG 12094	
VIB 459	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	shrimp	Thailand
VIB 461	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	shrimp	Thailand
VIB 462	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	shrimp	Thailand
VIB 463	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	shrimp	Thailand
VIB 611	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 33844	
VIB 612	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17803	
VIB 797	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	shrimp	China
VIB 799	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	Thailand, shrimp	
VIB 800	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	shrimp	Thailand

注: LMG 指比利时根特大学微生物实验室收集菌株; ^T 指标准菌株。

Note: LMG represents culture collection of the Laboratorium voor Microbiologie, University of Gent, Belgium; ^T represents typical strain.

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取 海洋弧菌中的总DNA按照Ausubel等^[10]的方法提取。

1.2.2 地高辛 (DIG) 标记的 5 类溶血素基因探针的合成 从 GenBank 中获取所有弧菌的 5 类溶血素基因序列, 分别用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 进行同缘比对。根据保守区域设计 5 对引物 (表 2) 分别扩增 TLH、TDH、HlyA、 δ -VPH 和 HLX 溶血素基因片段。使用 DIG 探针合成试剂盒

(Roche), 以哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) VIB 645、副溶血弧菌 VIB 611、拟态弧菌 (*V. mimicus*) VIB 298 和副溶血弧菌 VIB 462 基因组 DNA 为模板, PCR 合成地高辛标记的溶血素基因 TLH、TDH、HlyA、 δ -VPH 和 HLX 的部分序列, 作为溶血素基因探针。PCR 反应循环参数: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min。

表 2 合成 5 类地高辛标记的溶血素基因探针所用的引物

Tab.2 Primers designed to synthesize 5 kinds of DIG-labeled DNA probes

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	产物大小 /bp Product size	模板菌株 Templet strain
VHMF1 VHHR1	CACTTATGTCCGCTGCTGGT GCTGTGGTCGGGTGTGTTAC	1 058	哈维氏弧菌 VIB 645
TDHF1 TDHR1	TCCATCTGTCCCTTTTCCTG CCACTACCACTCTCATATGCTTC	425	副溶血弧菌 VIB 611
VMHF1 VMHR1	GACGCTCGATGCTTACTTCC CGTTGGGTCAAGTTCTGGTT	884	拟态弧菌 VIB 298
VPHF1 VPHR1	ATGAAACACCATGCACAACTT CTAGGCTTGTTTGCGTTTCTT	612	副溶血弧菌 VIB 462
HLXF1 HLXR1	OCTATCCCATGCGGAGATAA TCGAGTTTATTGCTCGTCACTC	289	副溶血弧菌 VIB 462

1.2.3 5 类溶血素基因在弧菌中分布的 Southern Blot 检测 对提取的不同弧菌菌株的基因组 DNA 用 *EcoR* I (或 *Xba* I, *Pst* I, *Bam* H I, *Kpn* I, *Hind* III) 于 37 ℃ 酶切 2 h, 将酶切后的 DNA 在 1% 的琼脂糖上进行电泳, 电泳完毕后进行 Southern blotting^[11]。将凝胶上的 DNA 转移到尼龙膜上, 把膜放入杂交袋中, 按 15 mL/100 cm² 向袋中加入预热的杂交液 [5×SSC, 0.1% (w/v) N-十二烷基肌氨酸, 0.02% (w/v) SDS, 2% (w/v) 封闭液], 把 5 μL 探针加水至 100 μL, 煮沸变性 10 min, 加入到含尼龙膜的杂交袋中 (不要直接加到膜上), 混合均匀, 58 ℃ 过夜孵育。然后用低严谨缓冲液 [2×SSC, 0.1% (w/v) SDS] 室温孵育 2 次, 每次 5 min, 58 ℃ 预热高严谨缓冲液 [0.1×SSC, 0.1% (w/v) SDS], 用高严谨性缓冲液洗膜 2 次, 每次 15 min。加入抗地高辛抗体溶液孵育膜, 室温孵育 0.5 h, 最后在显色液中显色 0.5 h (抗体、显色液来自 Roche 试剂盒)。

1.2.4 鱼血平板溶血试验 采取健康大菱鲆的新

鲜血液, 用 20 mmol/L Tris 盐缓冲液 (TBS: 20 mmol/L Tris-碱; 0.85% NaCl; pH 7.5) 洗涤 3 次 (2 000 g, 4 ℃, 离心 3 min), 最后用 TBS 配制成体积分数为 10% 的红细胞悬液。将 17 mL 55 ℃ 的 2216E 固体培养基和 3 mL 10% 大菱鲆红细胞悬液混合, 倒平板。无菌条件下, 使用接种针将预先活化的菌株接种到血平板上, 28 ℃ 过夜培养。菌落周围出现透明圈者为阳性。

1.2.5 磷脂酶活性测定 磷脂酶活性按 Liu 等^[12]所示方法进行测定。配制 2216E 固体培养基, 加入体积分数为 1% 的新鲜蛋黄, 制成平板。在平板上接菌, 28 ℃ 过夜培养。菌落周围出现乳白色半透明圈者为阳性。

1.2.6 VHH/TLH 和 TDH 溶血素基因的克隆及序列分析 以哈维氏弧菌 VIB 645 的 DNA 为模板, VHMF1 和 VHHR1 为引物, PCR 扩增其 VHH/TLH 溶血素基因; 以副溶血弧菌 VIB 611 的 DNA 为模板, TDHF1 和 TDHR1 为引物, PCR 扩增其 TDH 溶血素基因。由上海生物工程公司进行 DNA

序列测定,用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) 进行 DNA 序列分析。

2 结果与分析

2.1 5类溶血素基因在不同弧菌中的分布

2.1.1 TLH 溶血素基因的分布 在检测的 57 株菌中(下同),13 株弧菌标准菌株有强杂交信号,包括 2 株溶藻胶弧菌 (*V. alginolyticus*)、2 株哈维氏弧菌、1 株霍氏格里蒙菌 (*Grimontia hollisae*)、1 株坎贝氏弧菌 (*V. campbellii*)、1 株辛辛那提弧菌 (*V. cincinnatiensis*)、1 株费氏弧菌 (*V. fischeri*)、1 株拟态弧菌、1 株飘浮弧菌 (*V. natriegens*)、1 株副溶血弧

菌、1 株解蛋白弧菌 (*V. proteolyticus*) 和 1 株火神弧菌 (*V. logei*)。6 株弧菌标准菌株有弱杂交信号,包括鳗弧菌 (*V. anguillarum*)、河口弧菌 (*V. aestuarianus*)、美人鱼发光杆菌 (*Ph. damsela*)、河弧菌 (*V. fluvialis*)、弗尼斯弧菌 (*V. furnissii*) 和创伤弧菌 (*V. vulnificus*),而另外 7 株弧菌标准菌株中无杂交信号。20 株哈维氏弧菌分离菌株至少含有 1 条杂交带,其中菌株 VIB 645、VIB 648 和 SF-1 均含有 2 条杂交带。11 株副溶血弧菌分离菌株中,除 1 株外其余菌株均含有 1 条杂交带。阳性率为 85.96% (表 3)。

表 3 Southern blotting 及溶血活性和磷脂酶活性的检测结果

Tab.3 Southern hybridization results and the detections of hemolytic activities and phospholipase activities

菌株号 Strain code	溶血素基因家族 Haemolysin gene family					磷脂酶活性 Phospholipase activity	溶血活性 Haemolytic activity
	TLH	TDH	HlyA	HLX	δ -VPH		
VIB72 鳗弧菌	(+)	—	—	—	—	+	+
VIB281 河口弧菌	(+)	—	—	—	—	+	++
VIB283 溶藻胶弧菌	+	—	—	(+)	—	++	++
VIB284 溶藻胶弧菌	+	—	—	(+)	—	++	++
VIB285 坎贝氏弧菌	+	—	(+)	—	—	++	++
VIB286 哈维氏弧菌	+	—	—	—	—	+++	++
VIB287 辛辛那提弧菌	+	—	—	+	—	++	++
VIB288 肋生盐弧菌	—	—	—	—	—	—	—
VIB289 美人鱼发光杆菌	(+)	—	—	—	—	+++	+++
VIB290 双氮养弧菌	—	—	—	(+)	—	—	—
VIB291 费氏弧菌	+	—	—	—	—	—	+
VIB292 河弧菌	(+)	—	—	—	—	+	+
VIB293 弗尼斯弧菌	(+)	—	—	—	—	++	+++
VIB294 产气弧菌	—	—	—	—	—	—	—
VIB295 哈维氏弧菌	+	—	—	—	—	+	+++
VIB296 地中海弧菌	—	—	—	—	—	—	—
VIB298 拟态弧菌	+	—	+	—	—	+	++
VIB299 飘浮弧菌	+	—	—	—	—	+	+
VIB301 沙蚕弧菌	—	—	—	—	—	—	—
VIB304 副溶血弧菌	+	—	—	+	—	++	++
VIB305 远洋弧菌	—	—	—	—	—	—	—
VIB306 解蛋白弧菌	+	—	—	—	—	++	++
VIB309 塔氏弧菌	—	—	—	—	—	++	++
VIB310 创伤弧菌	(+)	—	—	—	—	+	+
VIB314 霍氏格里蒙菌	+	+	—	+	(+)	+	++
VIB414 火神弧菌	+	—	—	—	—	—	++
VIB351 哈维氏弧菌	+	—	—	—	—	+++	++
VIB391 哈维氏弧菌	+	—	—	(+)	—	++	++
VIB395 哈维氏弧菌	+	—	—	(+)	—	++	+

续表

菌株号 Strain code	溶血素基因家族 Haemolysin gene family				δ -VPH	磷脂酶活性 Phospholipase activity	溶血活性 Haemolytic activity
	TLH	TDH	HlyA	HLX			
VIB400 哈维氏弧菌	+	-	-	(+)	-	+	++
VIB410 哈维氏弧菌	+	-	-	+	-	+	++
VIB571 哈维氏弧菌	+	-	-	(+)	-	+++	+++
VIB572 哈维氏弧菌	+	-	-	-	-	++	++
VIB642 哈维氏弧菌	+	-	-	(+)	-	+++	+++
VIB645 哈维氏弧菌	+	-	-	(+)	-	+++	+++
VIB646 哈维氏弧菌	+	-	-	(+)	-	++	++
VIB647 哈维氏弧菌	+	-	-	(+)	-	-	++
VIB648 哈维氏弧菌	+	-	-	(+)	-	+++	+++
VIB649 哈维氏弧菌	(+)	-	-	(+)	-	+++	+
VIB651 哈维氏弧菌	+	-	-	(+)	-	++	++
VIB652 哈维氏弧菌	+	-	-	(+)	-	+	++
VIB653 哈维氏弧菌	+	-	-	-	-	+	++
VIB658 哈维氏弧菌	+	-	-	-	-	+++	++
VIB659 哈维氏弧菌	+	-	-	(+)	-	++	++
SF1 哈维氏弧菌	+	-	-	-	-	+++	+++
VBA642 哈维氏弧菌	+	-	-	-	-	++	++
VIB457 副溶血弧菌	-	-	-	-	-	-	-
VIB458 副溶血弧菌	+	-	-	(+)	-	++	++
VIB459 副溶血弧菌	(+)	-	-	+	-	++	++
VIB461 副溶血弧菌	+	-	-	+	-	++	++
VIB462 副溶血弧菌	+	-	-	+	(+)	++	++
VIB463 副溶血弧菌	+	-	-	+	-	+	++
VIB611 副溶血弧菌	(+)	+	-	+	-	++	++
VIB612 副溶血弧菌	+	-	-	+	-	+	+
VIB797 副溶血弧菌	+	-	-	+	-	++	++
VIB799 副溶血弧菌	+	-	-	(+)	(+)	+	++
VIB800 副溶血弧菌	+	-	-	+	-	+++	+++

注:2~27行,标准菌株;28~58行,分离菌株;2~6列,“+”代表杂交信号强;“(+)”代表杂交信号弱;“-”代表无杂交信号;杂交信号的强弱程度是通过阳性对照来界定的;7~8列,“+++”代表菌落周围透明圈或半透明圈半径大于4mm;“++”代表菌落周围透明圈或半透明圈半径为2~4mm;“+”代表菌落周围透明圈或半透明圈半径为0.5~2mm;“-”代表无透明圈或半透明圈。

Note: Lines 2-27, typical strains; Lines 28-58, isolated strains; Lanes 2-6, “+” represents strong hybridization signal; “(+)” represents weak hybridization signal; “-” represents no hybridization signal. The strong or weak degree of hybridization signal is scaled by positive control. Lanes 7-8, “+++” represents semidiameter of zone of clearing or opalescence (>4 mm); “++” represents semidiameter of zone of clearing or opalescence (2-4 mm); “+” represents semidiameter of zone of clearing or opalescence (0.5-2 mm); “-” represents no zone of clearing or opalescence.

2.1.2 TDH 溶血素基因的分布 检测出2株弧菌有强杂交信号,包括霍氏格里蒙菌 VIB 314 和副溶血弧菌 VIB 611,并且这2株菌中均含2条杂交带(表3)。将 VIB 314 和 VIB 611 的基因组用另外5种酶进行消化,杂交结果显示,除一种酶外,其余均检测到2条杂交带(图1),推测 VIB 314 和 VIB 611

可能均含有2个非常相似的溶血素基因。在其他弧菌菌株中无杂交信号。阳性率为3.51%。

2.1.3 HlyA 溶血素基因的分布 检测出拟态弧菌 VIB 298 中有强杂交信号,坎贝氏弧菌 VIB 285 中有弱杂交信号,而在其他种弧菌中没有检测到杂交信号(表3),阳性率为3.51%。

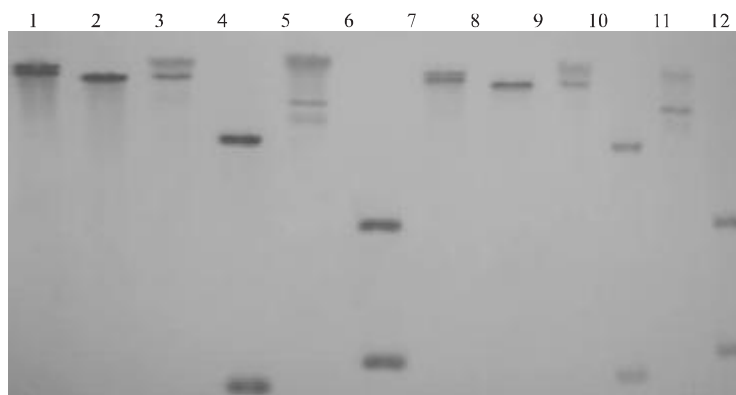


图1 探针 TDH 对 5 种限制性内切酶消化霍氏格里蒙菌 VIB 314 和副溶血弧菌 VIB 611 基因组 DNA 的 Southern 杂交分析

1~6, VIB 314; 7~12, VIB 611. 1, 7, *Xba* I; 2, 8, *Pst* I; 3, 9, *Bam*HI; 4, 10, *Eco*RI; 5, 11, *Kpn* I; 6, 12, *Hind*III.

Fig.1 Southern hybridization analysis DNA digested with 5 restriction enzymes from *Grimontia hollisae* VIB 314 and *V. parahaemolyticus* VIB 611 with TDH probe

Lanes 1-6, VIB 314; Lanes 7-12, VIB 611. 1, 7, *Xba*I; 2, 8, *Pst*I; 3, 9, *Bam*HI; 4, 10, *Eco*RI; 5, 11, *Kpn*I; 6, 12, *Hind*III

2.1.4 δ -VPH 溶血素基因的分布 检测出 3 株弧菌中有弱杂交信号,包括 2 株副溶血弧菌和 1 株霍氏格里蒙菌,在其他弧菌菌株中没有检测到杂交信号(表 3),阳性率为 5.26%。

2.1.5 HLX 溶血素基因的分布 检测出 12 株弧菌中有强杂交信号,包括 9 株副溶血弧菌,1 株辛辛

那提弧菌、1 株霍氏格里蒙菌和 1 株哈维氏弧菌。在 18 株弧菌菌株中检测到弱杂交信号,包括 2 株溶藻弧菌、13 株哈维氏弧菌、2 株副溶血弧菌和 1 株双氮养弧菌(*V. diazotrophicus*) (图 2),在其他弧菌菌株中没有检测到杂交信号(表 3)。阳性率为 52.63%。

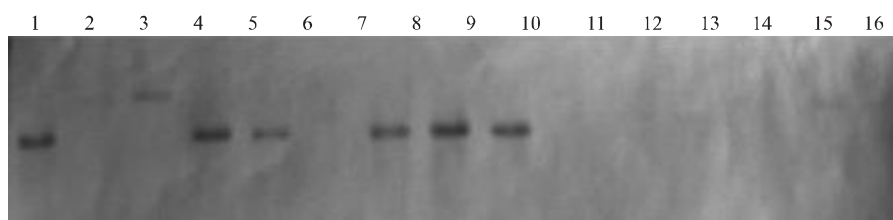


图2 Southern blotting 对不同弧菌中 HLX 溶血素基因的检测

注:每株弧菌的基因组 DNA 用限制性内切酶 *Eco*RI 消化。

Fig.2 Detection of HLX haemolysin genes in different *Vibrio* strains

Note: Total DNA from each strain was digested by *Eco*RI.

1-16, VIB 462, VIB 400, VIB 410, VIB 459, VIB 797, VIB 799, VIB 800, VIB 611, VIB 612, VIB 351, VIB 391, VIB 395, VIB 571, VIB 572, VIB 645, VIB 648

2.2 溶血活性的测定

具有强溶血活性(菌落周围透明圈半径大于 4 mm)的有 9 株弧菌,包括 6 株哈维氏弧菌、1 株美人鱼发光杆菌、1 株弗尼斯弧菌和 1 株副溶血弧菌;溶血活性较强(透明圈半径在 2~4 mm 之间)的有 33 株弧菌,包括 14 株哈维氏弧菌、9 株副溶血弧菌、2 株溶藻弧菌、1 株河口弧菌、1 株坎贝氏弧菌、1

株辛辛那提弧菌、1 株拟态弧菌、1 株解蛋白弧菌、1 株塔氏弧菌(*V. tubiashii*)、1 株霍氏格里蒙菌和 1 株火神弧菌;溶血活性弱(透明圈半径在 0.5~2 mm 之间)的有 8 株弧菌,包括 3 株哈维氏弧菌、1 株鳗弧菌、1 株费氏弧菌、1 株河弧菌、1 株飘浮弧菌和 1 株创伤弧菌;无溶血活性的有 7 株弧菌,包括肋生盐弧菌(*Salinivibrio costicola* subsp. *costicola*)、双氮养

弧菌、产气弧菌 (*V. gazogenes*)、地中海弧菌 (*V. mediterranei*)、沙蚕弧菌 (*V. nereis*)、远洋弧菌 (*V. pelagia*) 及副溶血弧菌各 1 株 (表 3)。

2.3 磷脂酶活性的测定

具有强磷脂酶活性 (菌落周围乳白色半透明圈半径大于 4 mm) 的有 11 株弧菌, 包括 9 株哈维氏弧菌、1 株副溶血弧菌和 1 株美人鱼发光杆菌; 磷脂酶活性较强 (半透明圈半径在 2~4 mm) 的有 21 株, 包括 7 株哈维氏弧菌、7 株副溶血弧菌、2 株溶藻弧菌、1 株坎贝氏弧菌、1 株辛辛那提弧菌、1 株弗尼斯弧菌、1 株解蛋白弧菌和 1 株塔氏弧菌; 有弱磷脂酶活性 (半透明圈半径在 0.5~2 mm 之间) 的有 15 株, 包括 5 株哈维氏弧菌、3 株副溶血弧菌、1 株鳗弧菌、1 株河口弧菌、1 株河弧菌、1 株拟态弧菌、1 株飘浮弧菌、1 株创伤弧菌和 1 株霍氏格里蒙菌; 无磷脂酶活性的菌株有 10 株, 包括肋生盐弧菌、双氮养弧菌、费氏弧菌、产气弧菌、地中海弧菌、沙蚕弧菌、远洋弧菌、火神弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌各 1 株 (表 3)。

2.4 海洋弧菌菌株中 VHH/TLH 和 TDH 溶血素基因的序列分析

DNA 序列测定结果表明, 本实验测定的哈维氏弧菌 VIB 645 的 VHH/TLH 溶血素基因与 GenBank 中发表的哈维氏弧菌 VIB 645 的 VHH 溶血素基因的序列完全一致。副溶血弧菌 VIB 611 的 TDH 溶血素基因与 GenBank 中发表的副溶血弧菌的 TDH 溶血素基因的相似性达到 98%。

3 讨论

溶血素被认为是许多病原菌的致病因子, 溶血素基因在弧菌中普遍存在, 且不同弧菌的溶血素基因相差较大^[13]。张晓华等^[3]研究了多个不同来源的哈维氏弧菌菌株, 发现哈维氏弧菌对鱼的致病性与哈维氏弧菌胞外产物 (ECP) 中的溶血素相关。致病力最强的哈维氏弧菌菌株 VIB 645 含有两个碱基序列相似的 TLH/VHH 溶血素基因, 并且具有较强的溶血活性和磷脂酶活性^[14-15]。本研究也检测出 1 株霍氏格里蒙菌 VIB 314 和 1 株副溶血弧菌 VIB 611 均含有 2 个 TDH 溶血素基因, 可见双拷贝溶血素基因在弧菌中并不罕见, 但这两株菌是否具有强致病力还有待进一步研究。

据报道, 除副溶血弧菌以外, 又在霍氏格里蒙菌、拟态弧菌和霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 非 O1 型中发现了 TDH 溶血素基因^[16-20], 霍乱弧菌 El Tor

O1 菌株和非 O1 菌株能够产生一种水溶性的溶细胞毒素, 被命名为 HlyA 或 E1 Tor 溶血素^[21], 在副溶血弧菌中还发现一种热不稳定性溶血素 TLH 和一种热稳定性溶血素 δ -VPH^[22]。本实验利用 Southern Blot 检测 5 类溶血素基因在 57 株弧菌中的分布。分析表明, TLH 溶血素基因广泛分布于弧菌中, 尤其是在哈维氏弧菌相关的菌株 (包括哈维氏弧菌、坎贝氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌和飘浮弧菌) 和费氏弧菌相关的菌株 (包括费氏弧菌和火神弧菌) 中分布较广。HLX 溶血素基因在哈维氏弧菌和副溶血弧菌中分布较多, 在溶藻弧菌、辛辛那提弧菌、双氮养弧菌和霍氏格里蒙菌中也有分布。TDH、HlyA 及 δ -VPH 溶血素基因的阳性率均小于 6%, 表明 TDH、HlyA 及 δ -VPH 溶血素基因在弧菌中分布较少。另外, 本实验还将哈维氏弧菌 VIB 645 的 VHH/TLH 溶血素基因和副溶血弧菌 VIB 611 的 TDH 溶血素基因进行测序, 通过比对分析, 进一步验证了杂交结果。

热不稳定性溶血素 TLH, 也称之为卵磷脂性溶血素 (LDH), 它具有磷脂酶 A2 或溶血磷脂酶活性^[23]。分析表明, 在研究的 57 株弧菌中, 100% 含有 TLH 溶血素基因的弧菌具有溶血活性, 92.98% 含有 TLH 溶血素基因的弧菌具有磷脂酶活性, 而其他 4 类溶血素基因的存在与否对弧菌溶血活性和磷脂酶活性没有明显影响。因此, 弧菌溶血活性和磷脂酶活性与 TLH 溶血素基因具有显著相关性, 与另外 4 类溶血素基因的关系不密切。并且有 36 株具有较强溶血活性 (透明圈半径大于 2 mm) 的弧菌和 27 株具有较强磷脂酶活性 (半透明圈半径大于 2 mm) 的弧菌, 其与 TLH 溶血素基因的杂交信号强, 5 株具有弱溶血活性或磷脂酶活性 (透明圈或半透明圈半径在 0.5~2 mm 之间) 的弧菌, 其与 TLH 溶血素基因的杂交信号弱。故多数弧菌的溶血活性和磷脂酶活性的强弱与 TLH 溶血素基因杂交信号的强弱存在正相关性。但也存在少数例外情况, 如美人鱼发光杆菌、弗尼斯弧菌、塔氏弧菌和哈维氏弧菌 VIB 649, 其溶血活性或磷脂酶活性较强, 但杂交信号弱或无杂交信号。几乎所有无 TLH 溶血素基因杂交信号的菌株, 都没有溶血活性和磷脂酶活性。均具有 2 个 TLH 溶血素基因的 3 株哈维氏弧菌, 其溶血环和溶解环的半径为 6 mm 至 7 mm, 明显大于其他菌株, 说明具有两个拷贝溶血素基因的弧菌, 其溶血活性和磷脂酶活性均较强。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish[M]. 3rd ed. Godalming: Springer-Praxis, 1999.
- [2] Sunaryanto A, Mariam A. Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries[J]. Bull Brackishwat Aquacult Dev Cent, 1986, 8: 105 – 112.
- [3] Zhang X H, Austin B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to Salmonids[J]. J Fish Dis, 2000, 23: 93 – 102.
- [4] Iida T, Honda T. Hemolysins produced by vibrios[J]. J Toxicol-Toxin Rev, 1997, 16: 215 – 227.
- [5] Kreger A S, Bernheimer A W, Etkin L A, et al. Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes[J]. Infect Immun, 1987, 55: 3 209 – 3 212.
- [6] Ludwig A, Goebel M. Haemolysins of *Escherichia coli* [M]// Mechanisms 544 of Virulence. Cambridge: Cambridge University Press, 1997: 281 – 329.
- [7] Shinoda S. Protein toxins produced by pathogenic vibrios[J]. J Nat Toxins, 1999, 8: 259 – 269.
- [8] Zhang X H, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98: 1 011 – 1 1019.
- [9] Garrity G M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. 2nd ed. II: The Proteobacteria. New York: Springer-Verlag, 2005.
- [10] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Current Protocols in Molecular Biology[M]. New York: Wiley, 1987.
- [11] Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis[J]. J Mol Biol, 1975, 98: 503 – 517.
- [12] Liu P C, Lee K K, Chen S N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. Lett Appl Microbiol, 1996, 22: 413 – 416.
- [13] 陈吉祥, 杨慧, 严显辉, 等. 致病性哈维氏弧菌溶血素基因克隆及其检测[J]. 中国水产科学, 2005, 12 (9): 580 – 586.
- [14] Zhang X H, Meaden P G, Austin B D. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi* [J]. Appl Environ Microb, 2001, 67 (7): 3 161 – 3 167.
- [15] Zhong Y, Zhang X H, Chen J, et al. Overexpression, purification, characterization and pathogenity of *Vibrio harveyi* haemolysin VHH[J]. Infect Immun, 2006, 74: 6 001 – 6 005.
- [16] Baba K, Shirai H, Terai A, et al. Similarity of the *tdh* gene – bearing plasmids of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microb Pathogenesis, 1991b, 10: 61 – 70.
- [17] Nishibuchi M, Kaper J B. Duplication and variation of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Mol Microbiol, 1990, 4: 87 – 99.
- [18] Shinoda S, Nakagawa T, Shi L, et al. Distribution of virulence – associated genes in *Vibrio mimicus* isolates from clinical and environmental origins [J]. Microbiol Immunol, 2004, 48: 547 – 551.
- [19] Terai A, Baba K, Shirai H, et al. Evidence for insertion sequence-mediated spread of the thermostable direct hemolysin gene among *Vibrio* species[J]. J Bacteriol, 1991, 173: 5 036 – 5 046.
- [20] Yamasaki S, Wright A C, Kaper J B, et al. Analysis of the gene of *Vibrio hollisae* encoding the haemolysin similar to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. FEMS Microbiol Lett, 1991, 80: 259 – 264.
- [21] Ichinose Y, Yamamoto K, Nakasone N, et al. Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae* [J]. Infect Immun, 1987, 55: 1 090 – 1 093.
- [22] Taniguchi H, Kubomura S, Hirano H, et al. Cloning and characterization of a gene encoding a new thermostable hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. FEMS Microbiol Lett, 1990, 67: 339 – 346.
- [23] Shinoda S, Matsuoka H, Tsuchie T, et al. Purification and characterization of a lecithin-dependent hemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene[J]. J Gen Appl Microbiol, 1991, 137: 2 705 – 2 711.

Distribution of five kinds of haemolysin genes in different vibrios and their correlation with activities of haemolytic and phospholipase

WANG Shu-xian, ZHANG Xiao-hua, SUN Bo-guang, CHEN Ji-xiang

(Department of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Vibrios are normal inhabitants in aquatic environments and very common in marine and estuarine habitats. Many studies have reported that *Vibrio* species are pathogenic to marine shrimps and fish. Haemolysin, which is an exotoxin that attacks blood cell membranes and causes cell rupture, is arguably the most widely distributed toxin among pathogenic vibrios. Haemolysis may result from the enzymatic activities demonstrated by some species of bacteria, including phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* and phospholipase D in *Photobacterium damsela* ssp. *damsela*. However, many other haemolysins act by forming

pores in the cytoplasmic membrane of erythrocytes. In many cases, the pore-forming activity of haemolysin is not restricted to erythrocytes, but extends to a wide range of other cell types including mast cells, neutrophils, and polymorphonuclear cells, and enhances virulence by causing tissue damage. Currently, five representative haemolysin families were found in *Vibrio* sp., including the TDH (thermostable direct haemolysin) family of *V. parahaemolyticus*, the HlyA (E1 Tor haemolysin) family of *V. cholerae*, the TLH (thermolabile haemolysin) family of *V. parahaemolyticus*, the δ -VPH (thermostable haemolysin) family of *V. parahaemolyticus* and the HLX family of *V. cholerae* O1. Each type of haemolysin gene was aligned using ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/>), and five pairs of PCR primers were designed from the conserved region of the haemolysin genes and amplified the haemolysin gene fractions of TLH, TDH, HlyA, δ -VPH and HLX. Five DIG-labelled haemolysin gene probes were synthesized by PCR amplification from total DNA of different *Vibrio* strains, and were used to detect the distributions of the five haemolysin genes among 57 *Vibrio* strains by Southern Blot. The results showed that 2 *Vibrio* strains had TDH haemolysin gene; 2 strains had HlyA haemolysin gene; 49 strains had TLH haemolysin gene; 3 strains had δ -VPH haemolysin gene and 30 strains had HLX haemolysin gene. From these results, it seems that TLH haemolysin gene was widely distributed in different *Vibrio* species, and the positive ratio was as high as 85.96%. HLX haemolysin gene was widely distributed among *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* and was also found in *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. diazotrophicus* and *Grimontia hollisae*, and the positive ratio was 52.63%. However, the positive ratios of TDH, HlyA and δ -VPH haemolysin genes were less than 6%. Moreover, one strain of *Grimontia hollisae* and one strain of *V. parahaemolyticus* had duplicated *tdh* genes. It seems that duplication of haemolysin genes in vibrios is not rare.

Fifty-seven isolates of vibrios were inoculated on the fish blood agar plate and egg yolk plates respectively, and the activities of haemolytic and phospholipase were determined by the appearance of a lytic zone and opalescence around the bacterial growth. It was found that all the vibrios strains with TLH haemolysin gene had haemolytic activities. Except *V. fischeri*, *V. gazogenes*, *V. logei* and *V. harveyi* VIB 647, all the other vibrio strains that had TLH haemolysin gene also had phospholipase activities. Most vibrio strains that had strong haemolytic and phospholipase activities also had strong hybridization signals for TLH haemolysin gene. However, there were also some exceptions, e. g. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *V. furnissii*, *V. tubiashii* and *V. harveyi* VIB 649, which had strong haemolytic or phospholipase activities, had weak or no hybridization signals. Almost all the vibrio strains which had no hybridization signals for TLH haemolysin gene had no haemolytic or phospholipase activities. The haemolytic or phospholipase activities in the 3 *V. harveyi* isolates which had duplicated TLH haemolysin genes were stronger than those in others strains. This suggests that the haemolytic or phospholipase activities of *V. harveyi* were also correlated with duplication of TLH haemolysin genes. From these results, it comes the conclusion that haemolytic and phospholipase activities of *Vibrio* species are closely correlated with the distribution of TLH haemolysin gene, but not with the other 4 types of haemolysin genes. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 570 – 578]

Key words: *Vibrio*; haemolysin gene; haemolytic activity; phospholipase activity

Corresponding author: ZHANG Xiao-hua. E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn