

鳗弧菌、溶藻胶弧菌外膜蛋白的分离及特性

周丽, 刘洪明, 战文斌, 宋微波

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东青岛266003)

摘要:分别用 SDS、Sarkosyl 及 PMSF 法分离制备鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、溶藻胶弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 主要外膜蛋白 (MOMP), 通过 SDS-PAGE 分析比较 2 种弧菌主要外膜蛋白的组成结构。结果表明, SDS、Sarkosyl 和 PMSF 法分离提取的鳗弧菌和溶藻胶弧菌外膜蛋白中, SDS-PAGE 电泳图谱不同, 鳗弧菌外膜蛋白分子量为 27~138 kD; 溶藻胶弧菌外膜蛋白分子量为 27~104 kD, 其中, 45 kD、30 kD 和 27 kD 外膜蛋白为鳗弧菌和溶藻胶弧菌所共有。经比较, Sarkosyl 法对 2 种弧菌外膜蛋白的提取效果较好。对 3 种方法提取的 2 种弧菌的主要外膜蛋白进行 SDS PAGE 后, 分别与吸附后的兔抗鳗弧菌、抗溶藻胶弧菌血清的 Western-blotting 印迹显示, 兔抗鳗弧菌血清与其菌株的外膜蛋白主要有 3 条免疫反应带, 其分子量分别为 97 kD、51 kD 和 30 kD, 说明其可能与鳗弧菌抗原的特异性有关; 兔抗溶藻胶弧菌血清与其菌株的外膜蛋白主要有 2 条免疫反应带, 其分子量分别为 51 kD 和 27 kD, 说明可能与溶藻胶弧菌抗原的特异性有关, 而 51 kD 外膜蛋白可能是 2 种弧菌共有的特异性抗原。

关键词: 鳗弧菌; 溶藻胶弧菌; 外膜蛋白

中图分类号: S941

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2003)01-031-05

弧菌病是水产养殖经济动物中最为严重的疾病之一, 其暴发性流行可导致养殖鱼虾大量死亡。鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 能引起世界范围内的 50 多种海水淡水养殖鱼类及其他养殖动物发生弧菌病^[1]。溶藻胶弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 也是海水养殖动物的常见致病菌, 养殖贝类、虾类等无壳动物比养殖鱼类更易感染该菌^[2]。鉴于弧菌病的危害, 对病原弧菌致病机理研究已成为弧菌病研究的重点。

水产动物病原性革兰氏阴性细菌表面的主要外膜蛋白 (Major Outer Membrane Protein, MOMP) 与细菌的致病性及免疫保护性密切相关^[3-6]。主要外膜蛋白是病原细菌疫苗的重要材料, 是制备免疫保护特异性强的疫苗的先决因素。若能分离出参与血清学反应的主要外膜蛋白, 提取特异性抗原, 制备疫苗,

将会大大提高疫苗的防治效果。近几年国内外逐渐有对弧菌外膜蛋白分离及其免疫特性的研究报道^[7-9], 国内仅有张晓华^[10]对副溶血弧菌外膜蛋白及其抗原性进行过研究, 对鳗弧菌和溶藻胶弧菌外膜蛋白的分离及特性还未见研究报道。本研究参考有关细菌膜蛋白分离提取方法^[11-13]并加以改进, 制备鳗弧菌和溶藻胶弧菌标准菌株的外膜蛋白, 通过 SDS-PAGE 对分离制备的 2 种弧菌外膜蛋白的组成结构进行比较分析, 最终确定分离制备鳗弧菌和溶藻胶弧菌外膜蛋白的有效方法, 并通过 Western-blotting 对 2 种弧菌外膜蛋白的抗原性进行检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 鳗弧菌、溶藻胶弧菌及迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 菌株由中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室提供, 接种于 2216E 培养基, 25℃ 培养 24 h。

1.1.2 纯系新西兰兔 山东济南农科院实验动物基地提供。

1.2 免疫血清的制备

鳗弧菌、溶藻胶弧菌于 25℃ 培养 24 h, PBS 洗

收稿日期: 2002-06-15。

基金项目: 教育部重点课题资助项目 (99184) 资助; 高等学校骨干教师资助计划资助。

作者简介: 周丽 (1963-), 女, 博士, 副教授, 主要从事水产动物病害与免疫学研究, E-mail: zhoulili@ouc.edu.cn

通讯作者: 战文斌 (1960-), 男, 博士, 教授, 主要从事水产动物病害与免疫学研究, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

脱,0.2%福尔马林灭活24 h。涂布平板无活菌。4℃离心(6 000 r/min, 20 min)去除福尔马林,PBS重悬。

用灭活的全菌隔周免疫新西兰兔,第3次加强免疫后5 d抽血测效价,大于1:3 200,第7天抽血,离心得抗血清,-80℃保存。

1.3 外膜蛋白的制备

按改进的SDS^[11]、Sarkosyl^[12]、PMSF^[13]方法分别进行。

1.3.1 SDS法 将富集培养的菌苔收集至7 mL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8),振荡均匀。4℃离心(6 000 r/min, 15 min)洗涤3次,弃上清液,菌细胞超声波破碎3 min (Sonics & Materials),上清液离心(18 000 r/min, 1 h),沉淀物悬浮在含2% SDS的10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7),32℃,30 min,离心(18 000 r/min, 30 min, 20℃),沉淀物再悬浮在50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7) (含0.4 mol/L NaCl, 1% SDS, 5 mmol/L EDTA, 0.05% 2-mercaptoethanol, 3 mmol/L NaN₃),37℃,2 h,离心(18 000 r/min, 30 min, 25℃),上清液置于含20%丙三醇的20 mmol/L Tris-HCl (pH

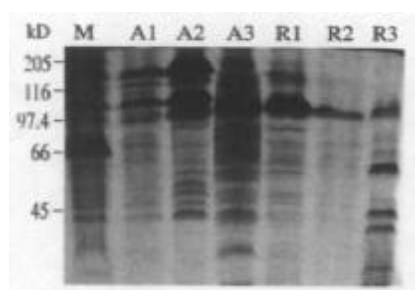
8)中过夜。

1.3.2 Sarkosyl法 菌细胞超声波破碎4 min,取上清液离心(18 000 r/min, 30 min),沉积菌苔加入Sarkosyl,32℃,30 min,离心(18 000 r/min, 30 min)弃上清,沉淀颗粒用20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)洗涤3次。

1.3.3 PMSF法 将富集培养菌苔收集至7 mL PBS,振荡均匀。4℃离心(6 000 r/min, 15 min),弃上清液,沉积菌苔加入2 mL含有10 mmol/L EDTA、2 mmol/L PMSF的PBS混匀,45℃水浴30 min,超声波破碎3 min,4℃离心(14 000 r/min, 20 min),取上清液,-20℃保存。

1.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

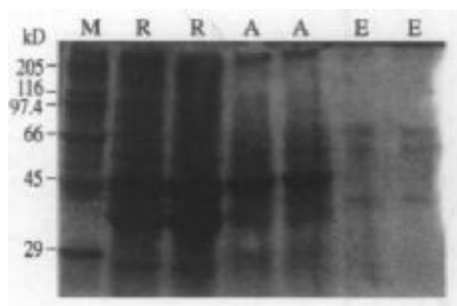
采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳。丙烯酰胺浓度:分离胶10%(体积分数),浓缩胶4.75%(体积分数)。每孔加15 μL样品,浓缩胶部分恒定电流为30 mA,分离胶部分恒定电流为60 mA。电泳结束后,凝胶入前固定液固定1 h,考马斯亮蓝(CBB)R 250 (Sigma)染色,以商品化的低分子量标准蛋白(Marker) (Sigma)的对数值和电泳迁移率绘制标准曲线,求出各分离蛋白的分子量。



A1—鳃弧菌外膜蛋白(SDS) R₁—溶藻弧菌外膜蛋白(SDS)
A2—鳃弧菌外膜蛋白(Sarkosyl) R₂—溶藻弧菌外膜蛋白(Sarkosyl)
A3—鳃弧菌外膜蛋白(PMSF) R₃—溶藻弧菌外膜蛋白(PMSF)
A1—OMPs of *V. anguillarum* by SDS R₁—OMPs of *V. alginolyticus* by SDS
A2—OMPs of *V. anguillarum* by Sarkosyl R₂—OMPs of *V. alginolyticus* by Sarkosyl
A3—OMPs of *V. anguillarum* by PMSF R₃—OMPs of *V. alginolyticus* by PMSF

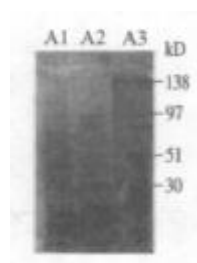
图1 SDS、Sarkosyl及PMSF 3种方法分离的鳃弧菌和溶藻弧菌外膜蛋白的SDS-PAGE图谱

Fig.1 SDS-PAGE of OMPs of *V. anguillarum* and *V. alginolyticus* prepared separately by SDS, Sarkosyl and PMSF methods



M—Marker
R—溶藻弧菌外膜蛋白
A—鳃弧菌外膜蛋白
E—爱德华氏菌外膜蛋白
R—OMPs of *V. alginolyticus*
A—OMPs of *V. anguillarum*
E—OMPs of *E. tarda*

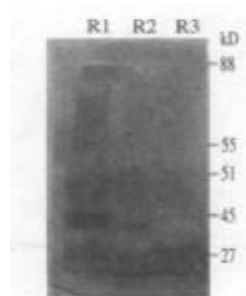
图2 Sarkosyl方法分离的溶藻弧菌、鳃弧菌及迟钝爱德华氏菌主要外膜蛋白的SDS-PAGE图谱
Fig.2 SDS-PAGE of MOMP of *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* and *E. tarda* prepared by Sarkosyl method



A1—SDS 法 (SDS method)
A2—Sarkosyl 法 (Sarkosyl method)
A3—PMSF 法 (PMSF method)

图3 兔抗鳃弧菌血清对鳃弧菌
外膜蛋白的 Western-blotting 印迹

Fig.3 Western-blotting profiles of OMPs of *V. anguillarum*



R1—SDS 法 (SDS method)
R2—Sarkosyl 法 (Sarkosyl method)
R3—PMSF 法 (PMSF method)

图4 兔抗溶藻胶弧菌血清对溶藻胶弧菌
外膜蛋白的 Western-blotting 印迹

Fig.4 Western-blotting profiles of OMPs of *V. alginolyticus*,

1.5 免疫印迹试验 (Western-blotting)

待测样品经 SDS-PAGE 分离后用 Mini-Protein II cell 系统 (BioRad) 电泳转移至 0.45 μ m 的硝酸纤维素膜上,电泳条件为 100 V 恒压转移 5 h, 4 $^{\circ}$ C。将硝酸纤维素膜用含有 2%~3% 牛血清白蛋白的 PBS 缓冲液封闭 30 min, PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液) 洗涤 3 次, 每次 5 min。然后将膜浸在 1:1 000 (体积比) 的兔抗鳃弧菌血清/PBS 或兔抗溶藻胶弧菌血清/PBS 中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。于 1:5 000 (体积比) 的碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG (Sigma)/PBS, 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。将膜置于含有 0.2 mg/mL DAB、0.015% H_2O_2 的 PBS (pH 5.0), 室温显色, 水洗终止反应。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 图谱

鳃弧菌和溶藻胶弧菌分别由 SDS、Sarkosyl 及 PMSF 分离制备的外膜蛋白经 SDS-PAGE 电泳显示 (图 1), 2 种弧菌外膜蛋白 SDS-PAGE 图谱不同, 鳃弧菌的外膜蛋白条带明显少于溶藻胶弧菌的, 并且同一种弧菌经 3 种不同方法 (SDS、Sarkosyl 及 PMSF) 分离制备的外膜蛋白 SDS-PAGE 图谱亦明显不同。

鳃弧菌 SDS-PAGE 图谱上, SDS 法分离制备的外膜蛋白主要有 4 条蛋白带, 分子量分别为 45、34、30

和 27 kD; Sarkosyl 法分离的外膜蛋白主要有 6 条明显的蛋白带, 分子量分别为 97、51、45、34、30 和 27 kD; PMSF 法分离制备的外膜蛋白有 7 条主要蛋白带, 分子量分别为 138、97、51、45、34、30 和 27 kD, 另有一些显示不太明显的蛋白带。由图谱分析可以看出, 分子量为 45、34、30 和 27 kD 的鳃弧菌外膜蛋白是 SDS、Sarkosyl 及 PMSF 法均可分离提取的蛋白组份。

溶藻胶弧菌 SDS-PAGE 图谱上, SDS 分离制备的外膜蛋白主要有 9 条蛋白带, 分子量分别为 104、96、59、55、45、40、33、30 和 27 kD; Sarkosyl 法分离的外膜蛋白主要有 12 条的蛋白带, 分子量分别为 104、96、88、82、74、59、51、45、40、33、30 和 27 kD; PMSF 法分离制备的外膜蛋白有 11 条主要蛋白带, 分子量分别为 104、96、88、82、74、59、45、40、33、30 和 27 kD。分子量分别为 104、96、59、45、40、33、30 和 27 kD 的溶藻胶弧菌外膜蛋白, 是 SDS、Sarkosyl 及 PMSF 法均可提取的蛋白组份。

鳃弧菌和溶藻胶弧菌有相同的外膜蛋白, 分子量为 45、30 和 27 kD 的为 2 种弧菌所共有。

用 Sarkosyl 法分别提取溶藻胶弧菌、鳃弧菌和迟钝爱德华氏菌外膜蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳 (图 2)。2 种弧菌的外膜蛋白与迟钝爱德华氏菌外膜蛋白结构差异较大, 迟钝爱德华氏菌外膜蛋白在分子量为 67、64、37 kD 处的主要蛋白带明显, 与溶藻胶弧菌及鳃弧菌主要外膜蛋白组成明显不同。

2.2 Western-blotting 印迹

SDS、Sarkosyl 及 PMSF 法分别提取的鳃弧菌、溶藻胶弧菌外膜蛋白进行 SDS-PAGE 后,经 Western-blotting 印迹测定了兔抗鳃弧菌、溶藻胶弧菌血清与外膜蛋白的免疫反应结果(图 3、4)。由图 3 可见,鳃弧菌经 SDS 分离的膜蛋白转印后主要有 3 条免疫反应发色带,分子量分别为 97、51 和 30 kD;Sarkosyl 分离的膜蛋白转印后有 4 条分子量分别为 138、97、51 和 30 kD 的免疫反应发色带;PMSF 分离的膜蛋白转印后免疫反应发色不明显。由图 4 可见,溶藻胶弧菌经 SDS 分离的膜蛋白转印后主要有 2 条分子量为 51 和 27 kD 的免疫反应发色带(R1);Sarkosyl 分离的膜蛋白转印后有 3 条主要免疫反应发色带,分子量分别为 51、45 和 27 kD (R2);PMSF 分离的膜蛋白转印后有 5 条免疫反应带,分子量分别为 88、55、51、45 和 27 kD(R3)。

3 讨论

同种细菌外膜蛋白的差别可能与细菌的培养条件、分离提取外膜蛋白的方法有关^[3]。本研究经 SDS、Sarkosyl 及 PMSF 法分离制备的鳃弧菌和溶藻胶弧菌主要外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱蛋白带表现出明显的不同。SDS 和 Sarkosyl 对 2 种弧菌外膜蛋白的提取效果都明显优于 PMSF 的提取效果;SDS 和 Sarkosyl 分离制备的 2 种弧菌的主要外膜蛋白条带清晰,而 PMSF 分离制备的 2 种弧菌外膜蛋白的蛋白带多而密集,难以正确区分主要外膜蛋白结构。SDS 和 Sarkosyl 相比较,Sarkosyl 法提取步骤较为简单省时,且制备细菌外膜蛋白的效果与 SDS 法相差不多。

在已报道的有关病原细菌(鳃弧菌、副溶血弧菌、杀鲑弧菌 *Vibrio salmonicida*、杀鲑气单胞菌 *Aeromonas salmonicida*、黄杆菌 *Flavobacterium psychrophilum*) 外膜蛋白分离及免疫特性研究^[3,8-9,14-15],Sarkosyl 是通常采用的方法。本文通过 SDS-PAGE,比较分析了 3 种提取细菌外膜蛋白的方法,认为 Sarkosyl 法对分离制备鳃弧菌及溶藻胶弧菌外膜蛋白的效果较好。

鳃弧菌和溶藻胶弧菌外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱各不相同,但鳃弧菌和溶藻胶弧菌也具有相同的分子量为 45、30 和 27 kD 的外膜蛋白。弧菌外膜蛋白作为不同种的标志,有可能在弧菌鉴定上有一定的意义;菌株间有相同的外膜蛋白,可能形成某些弧

菌间的共同抗原。爱德华氏菌外膜蛋白与鳃弧菌和溶藻胶弧菌外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱明显不同。表明不同种属细菌外膜蛋白结构差异较大,外膜蛋白有可能作为不同种属细菌的标志,利用不同种属细菌外膜蛋白结构的差异,作为细菌检测鉴定的重要依据之一。

鳃弧菌外膜蛋白经 SDS-PAGE 分离及 Western-blotting 转印后主要免疫反应条带分子量分别为 97、51 和 30 kD;溶藻胶弧菌经 3 种方法分离的外膜蛋白转印后均出现分子量为 51 和 27 kD 的免疫反应发色带。说明分子量为 97、51 和 30 kD 的外膜蛋白可能与鳃弧菌抗原的特异性有关;而 51、27 kD 外膜蛋白可能与溶藻胶弧菌抗原的特异性有关。Chart^[9]用 Sarkosyl 提取制备了鳃弧菌外膜蛋白,发现 49 kD 和 51 kD 的鳃弧菌外膜蛋白具有较强的抗原性,本研究亦发现鳃弧菌及溶藻胶弧菌血清与其外膜蛋白 Western-blotting 印迹反应,均有 51 kD 外膜蛋白与抗血清发生了特异性免疫反应,推测 51 kD 外膜蛋白可能是 2 种弧菌共有的特异性抗原。

参考文献:

- [1] Egidius E. Viriosis: Pathogenicity and pathology, A review [J]. Aquaculture, 1987, 67: 15-28.
- [2] 吴后波,潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病 [J]. 中国水产科学, 2001, 8 (1): 89-93.
- [3] Koga T, Kawata T. Isolation and characterization of the outer membrane from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Gen Microbiol, 1983, 129: 3 185-3 196.
- [4] Tu X L, Kuwai K. Antigenic profile and protective role of a 37 kDa major outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* [J]. Fish Pathol, 1999, 34(2): 59-64.
- [5] Lutwyche P, Exner M M, Hancock R E W, et al. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout [J]. Infect Immun, 1995, 63: 3 137-3 142.
- [6] Suzuki S, Kuroe K, Yasue K, et al. Antigenicity and N-terminal amino acid sequence of a 35 kD porin-like protein of *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum*: comparison among different serotypes and other bacterial species [J]. Lett Appl Microbiol, 1996, 23: 257-260.
- [7] Colquhoun J D, Sorum H. Outer membrane protein expression during in vivo cultivation of *Vibrio salmonicida* [J]. Fish & Shellfish Immun, 1998, 8:367-377.
- [8] Bogwald J, Stensvag K, Hoffman J, et al. Electrophoretic and immunochemical analysis of surface antigens of the fish pathogens *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum* [J]. J Fish Dis, 1990, 13: 293-301.
- [9] Chart H, Trust T J. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* [J]. Can J

- Microbiol, 1984, 30: 703 - 710.
- [10] 张晓华, 徐怀恕. 副溶血弧菌的外膜蛋白及其抗原性研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4 (4): 49 - 53.
- [11] Suzuki S, Kuroe K, Kusuda R. Characteristics of porin-like major outer membrane proteins of *Listonella anguillara* serotypes J-O-J, -2 and -3 [J]. Biochem Molec Biol Inemat, 1994, 32: 605 - 613.
- [12] Lutwyche P, Exner M M, Hancock R E W, et al. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout [J]. Infect Immun, 1995, 63: 3137 - 3142.
- [13] 张晓华, 徐怀恕. 弧菌标准菌株外膜蛋白的比较研究[J]. 微生物学报, 1997, 37 (6): 449 - 454.
- [14] Bernoth E M. Autogglutination, growth on tryptone-soy-Coomassieagar, outer membrane protein patterns and virulence of *Aeromonas salmonicida* strains [J]. J Fish Dis, 1990, 13: 145 - 155.
- [15] Rahman M H, Kuroda A, Dijkstra J M, et al. The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu [J]. Fish & Shellfish Immun, 2002, 12: 169 - 179.

Isolation and characteristics of major outer membrane proteins of aquatic pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio alginolyticus*

ZHOU Li, LIU Hong-ming, ZHAN Wen-bin, SONG Wei-bo

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

Abstract: Three different extraction methods (SDS, Sarkosyl and PMSF) were used for preparing major outer membrane proteins (MOMP) from the cell membrane fraction of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio alginolyticus*. The MOMP of the two vibrios were analyzed by using SDS-PAGE. The membrane proteins of molecular weight at 27 - 138 kD can be shown in OMP extracted from *Vibrio anguillarum* and 27 - 104 kD in OMP isolated from *Vibrio alginolyticus*. Both of the two strains contain the protein bands of molecular weights at 45 kD, 30 kD and 27 kD. By comparing the results of the three methods, Sarkosyl method was the best in evidence in extracting the OMPs of vibrios. Three MOMPs with molecular weights at 97 kD, 51 kD and 30 kD were distinctly detected in the Western-blotting with rabbit antiserum against *V. anguillarum* whole cell, indicating the three MOMPs were involved in the determination of the cell antigenicity. Two MOMPs with molecular weights at 51kD and 27 kD in the OMPs of *Vibrio alginolyticus* also presented strong antigens. The MOMP at 51 kD was a weak antigen common to both *Vibrio* species

Keywords: *Vibrio anguillarum*; *Vibrio alginolyticus*; outer membrane protein

中国水产科学研究院首席科学家简介

王清印,男,1952年8月出生,研究员,博士生导师,海洋生物与遗传育种专家。现任中国水产科学研究院黄海水产研究所副所长。长期从事海水养殖动植物的遗传育种、繁殖和发育生物学、海洋生物技术等研究。获农业部科技进步二等奖1项,中国科学院科技进步一等奖1项,山东省科技进步一等奖、三等奖各1项,申报国家发明专利1项,已公布。发表论文报告90余篇,合著专著4部。获农业部有突出贡献中青年专家、青岛市劳动模范、青岛市专业技术拔尖人才等荣誉称号。现任青岛海洋大学、厦门大学、上海水产大学兼职教授,国家“八六三”海洋生物技术主题专家组成员、中国水产学会海水养殖专业委员会副主任委员,以及中国海洋湖沼学会等多个学会的理事或专业委员会委员。