

## 嗜水气单胞菌细胞外膜蛋白及S层蛋白分析

董传甫, 林天龙, 俞伏松, 龚 晖

(福建省农业科学院 畜牧兽医研究所, 福建 福州 350003)

**摘要:**用十二烷基肌氨酸盐抽提结合超速离心纯化,制备了19株典型嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和1株温和气单胞菌(*A. sobria*)的主要外膜蛋白(MOMP)。根据SDS-PAGE图谱,将其中的14株菌分为3个MOMP组, I组的主要蛋白带为40 kD和43 kD, II组的主要蛋白带为40 kD和50 kD, III组的主要蛋白带为40 kD、46 kD和50 kD。MOMP组和血清型间没有严格的关系。用兔抗嗜水气单胞菌体抗原为第一抗体进行免疫印迹实验,结果显示,所有被试菌株都能产生强阳性反应,其中40 kD的蛋白带为大多数菌株所共有,且具有相似的免疫原性,是构成菌体抗原的重要免疫原。用0.2 mol/L甘氨酸缓冲液(pH 4.0)处理上述菌株培养物,结果仅有嗜水气单胞菌ZY01-g3能够分离到丰富的S层样蛋白,其分子量约为52 kD,而其他菌株未能分离到典型的S层样蛋白,表明S层蛋白的分布有限。

**关键词:**嗜水气单胞菌;血清型;主要外膜蛋白;S层蛋白  
**中图分类号:**Q936;Q939.91 **文献标识码:**A

**文章编号:**1005-8737-(2003)03-0201-05

革兰氏阴性菌的外膜结构多样,成分复杂,由于直接和宿主组织接触,因而在对宿主的感染与免疫中都起着重要的作用。其外膜成分,如荚膜、菌毛、脂多糖及外膜蛋白中的某些成分,都是重要的致病因子。同时这些膜表面成分又是诱导宿主产生免疫应答的重要保护性抗原。对嗜水气单胞菌而言,其外膜表面的菌毛<sup>[1-2]</sup>、O-抗原脂多糖<sup>[3]</sup>、S层蛋白<sup>[4-5]</sup>、细菌外膜上的某些糖反应外膜蛋白(Carbohydrate-Reaction outer membrane proteins, CROMPS)<sup>[6]</sup>和外膜蛋白<sup>[7]</sup>在对宿主的感染和免疫中的作用已得到认同,其中,部分主要外膜蛋白(major outer membrane protein, MOMP)具有一些较为特异的生物学功能,如组织粘附、补体(C1q)激活等<sup>[6,8]</sup>。同时, MOMP作为保护性免疫原也显示出良好的应用前景<sup>[7,9]</sup>,成为亚单位苗和基因工程苗研究的热点。此外,有资料显示,嗜水气单胞菌的S层蛋白<sup>[10]</sup>和

外膜蛋白<sup>[11-12]</sup>中的某些成份表现出一定的血清型特异性,有可能成为流行病学的标志。本实验是在对嗜水气单胞菌血清学分型研究的基础上(另文报道),分析不同嗜水气单胞菌菌株主要外膜蛋白的部分特性及其与血清型的相关关系,同时也对S层蛋白在不同血清型菌株中的分布做一定探讨,为嗜水气单胞菌新型亚单位疫苗的开发和应用提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细菌来源

所用菌株见表1。嗜水气单胞菌 Ah10501 购自北京陆桥公司;嗜水气单胞菌 9617、9809 和 9805 由华中农业大学水产学院陈孝煊副教授提供;NN13 由珠江水产研究所吴淑勤研究员提供;TPS-30、B-2 和 ATCC7966 由浙江淡水研究所钱冬研究员提供;B-Ah1、B-Ah6 和 B-Ah12 由福建省农业科学院生物中心郑伟文教授提供。其余菌株为本实验室自行分离鉴定(见表1)。

#### 1.2 菌体抗原的制备

培养收集细菌,0.85% (质量分数)灭菌盐水处理2次,常压沸水水浴1.5~2 h, 10 000 r/min

收稿日期:2002-09-04; 修订日期:2002-12-09.

基金项目:国家“八六三”资助项目(2001AA622050);福建省科委资助项目(2000Z077).

作者简介:董传甫(1975-)男,硕士,从事鱼病研究. Tel:0591-7817514. E-mail: dongchuanfu@sina.com

通讯作者:林天龙. Tel:0591-7817514

(BECKMEN, J-2550) 20 min, 4 °C 离心收集, 以生理盐水重悬为一定浓度即为菌体 O 抗原(O-Ag)。

### 1.3 抗血清制备及纯化

常规方法免疫家兔制备菌株 O 抗原抗血清, 使用 ImmunoPure(G) IgG Purification Kit(PIERCE) 分离纯化 O 抗原兔抗血清的 IgG。具体操作按试剂盒使用说明进行。

### 1.4 S 层蛋白的制备

S 层蛋白的分离与制备参考 Dooley 等<sup>[4]</sup>的方法进行, 主要步骤为: 培养收集细菌, 0.02 mol/L Tris-HCL(pH 7.5) 洗涤 3 次, 细菌重悬于 0.2 mol/L 甘氨酸缓冲液(浓盐酸调至 pH 4.0) 30 min, 每 10 min 振荡混匀 1 次, 10 000 r/min(BECKMEN, J-2550), 4 °C 离心 20 min, 取上清即为粗提的 S 层蛋白, 精制 S 层蛋白则需要进一步的 40 000 r/min, 30 min, 4 °C 离心收集。

表 1 实验菌株

Table 1 Nineteen strains of *Aeromonas hydrophila* and one strain of *A. sobria*

菌株编号 Strain code	血清型 O-serogroups	来源 Source	菌株编号 Strain code	血清型 O-serogroup	来源 Source
Ah 9617	O:9	湖北, 白鲢	ATCC7966	O:1	ATCC, 牛奶
Ah 9809	O:9	湖北, 草鱼	YT00-1	O:YT-1	福建, 欧鳊
Ah 9805	O:9	湖北, 鲤	YT01-715	O:YT-1	福建, 欧鳊
NN13	O:9	广东, 白鲢	BAh1	O:YT-1	福建, 中华鳖
TFS-30	O:9	浙江, 鳊	CHS00-3	O:CHS-3	福建, 欧鳊
Ah 10501	O:Ah 10501	北京, 陆桥	HB00-405	O:CHS-3	福建, 欧鳊
L 316	O:Ah 10501	福建, 日本鳊	WW00-3	O:WW3	福建, 欧鳊
BAh 6	O:Ah 10501	福建, 中华鳖	ZY00-5 <sup>①</sup>	O:CQ-1	福建, 欧鳊
BAh 12	O:Ah 10501	福建, 中华鳖	WC00-2	N <sup>②</sup>	福建, 欧鳊
B-2	O:5	浙江, 鲫	ZY01-g3	N <sup>②</sup>	福建, 欧鳊

注: ①温和气单胞菌; ②不属于本研究的任何血清分型。Note: ① *Aeromonas sobria*; ② Submitted to none of the O-serogroups in this research.

### 1.5 MOMP 的制备

MOMP 的提取参考 Kokka 等<sup>[11]</sup>的方法做适当改动, 主要过程为: 接种细菌于 250 mL TSB 培养肉汤中, 30 °C 150 r/min 摇床约 24 h, 10 000 r/min, 0.02 mol/L Tris-HCL(pH 7.5) 洗涤 2 次, 重悬于约 10 mL 上述缓冲液中, 200 W 超声波破碎共约 5 min, 7 000 r/min 4 °C 10 min 收集上清, 添加去污剂 N-lauroylsarcosinate(Sigma) 使其质量浓度为 1.2 g/mL, 混匀, 4 °C 隔夜静置。40 000 r/min(BECKMEN LK-80E) 4 °C 40 min, 下层沉淀即为主要外膜蛋白, 蒸馏水重悬, 按《蛋白质技术手册》<sup>[13]</sup> 描述以 BSA(华美) 绘制标准曲线, Bradford 法测定蛋白浓度, 分装, -20 °C 保存备用。

### 1.6 SDS-PAGE 及 WESTERN 印迹

采用 Mini-Protein cell II 系统(BioRad) 进行 SDS-PAGE 不连续垂直凝胶电泳, S 蛋白电泳应用 4% 浓缩胶和 10% 分离胶, MOMP 电泳及印迹应用 4% 浓缩胶和 12% 分离胶。凝胶染色(考马斯亮蓝染色)和免疫印迹参考《蛋白质技术手册》<sup>[13]</sup> 进行。染色凝胶每孔蛋白上样量 6~8 μg, 印迹用凝胶加样孔蛋白量则做 2~5 倍的缩减。免疫印迹, 1:

1 000 稀释—抗 R-IgG & O-Ag-Ah10501(兔抗嗜水气单胞菌 Ah10501 O 抗原抗血清 IgG), 1:20 000 稀释二抗(AP 酶标记的羊抗兔血清 IgG, Sigma), NBT-BCIP(Sigma) 显色。染色凝胶用未预览蛋白标准 M1(200 kD, 97.4 kD, 66.2 kD, 43 kD, 31 kD, 20.1 kD, 14 kD)(GIBCO), 印迹凝胶用预览蛋白标准 M2(175 kD, 83 kD, 62 kD, 47.5 kD, 31.2 kD, 25 kD, 16.5 kD, 6.5 kD)(GIBCO)。反对数法推算凝胶上主要蛋白条带的分子量。

## 2 结果

### 2.1 S 层蛋白特性

用 0.2 mol/L 甘氨酸缓冲液处理, 得到部分菌株的上清液能够检测到蛋白的存在。嗜水气单胞菌 ZY01-g3 和温和气单胞菌 ZY00-5 处理上清液蛋白含量丰富, 其他多数菌株培养物甘氨酸处理上清的蛋白含量不高, 需高度浓缩才能检测到。不同菌株的甘氨酸缓冲液处理上清在 SDS-PAGE 上的分布差别很大, 仅有 ZY01-g3(图 1, Lane3) 的甘氨酸处理上清液的蛋白中有一条接近 52 kD 的蛋白带, 和有关 S 层蛋白的报道<sup>[4,10-11]</sup> 接近, 推测该 52 kD 的蛋白

为S层蛋白,而其他菌株S层蛋白的提取及分子量的推算结果与有关报道不符。

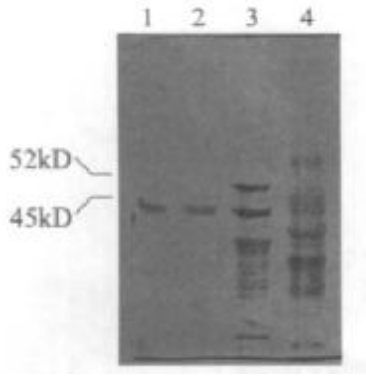


图1 气单胞菌甘油酸抽提物,考马斯亮蓝染色

Fig. 1 SDS-PAGE (10%) of glycine-extracted proteins from *Aeromonas* spp. Coomassie-brilliant blue stained

Lanes 1 and 2: HB00-405; Lane 3: ZY01-g3;  
Lane 4: ZY00-5

## 2.2 MOMP SDS-PAGE 及 Western blot

制备表1所列20株气单胞菌的MOMP,平均每株菌的蛋白收获量高达约4 mg,高于以往多数报道<sup>[8]</sup>。SDS-PAGE对其中18株菌的MOMP的分析显示(图2-A,C):上述菌株的MOMP主要包括了36~45 kD主带区的2~3条蛋白带和21~31 kD的2~3条次要蛋白带,其中次要蛋白带比较保守,除L316(图2-A Lane3)在28 kD处有所变异外,其余菌株都有28 kD和24 kD 2条次要蛋白带;主要蛋白带的变异则较大,其中14株菌(图2-A Lanes 2~10;图2-C Lane 2、Lanes 4~6、Lane 10)具有40 kD的主要蛋白带,10株菌(图2-A Lanes 2~4、Lanes 8~10;图2-C Lane 3、Lane 7、Lane 9、Lane 10)具有43 kD的主要蛋白带,6株菌(图2-A Lanes 5~7;图2-C Lanes 4~6)具有50 kD的主要蛋白带,4株菌(图2-C Lane 2、Lane 4、Lane 6、Lane 8)具有46 kD的主要蛋白带,其他蛋白带的分布则具多样化。根据这些主要蛋白带的图谱,将上述菌株进行简单的分组,Ⅰ组(主要蛋白带为40 kD和43 kD)7株菌(图2-A Lanes 2~4、Lanes 8~10;图2-C Lane 10),Ⅱ组(主要蛋白带为40 kD和50 kD)4株菌(图2-A Lanes 5~7;图2-C Lane 5),Ⅲ组(主要蛋白带为40 kD、46 kD和50 kD)2株菌

(图2-C Lane 4、Lane 6),其余菌株未有同型菌株,故暂未分组。ZY01-g3(图2-C Lane 9)的MOMP图谱显示,其50 kD处的蛋白含量丰富,与2.1的结果一致。用纯化的菌体抗原兔R-IgG & O-Ag-Ah10501为第一抗体,Western印迹显示,所有供试菌株都有强阳性反应产生,其中40 kD的蛋白带为多数菌株所共有,且具有相似的免疫原性,是构成菌体抗原的重要免疫原。

## 3 讨论

### 3.1 关于S层蛋白

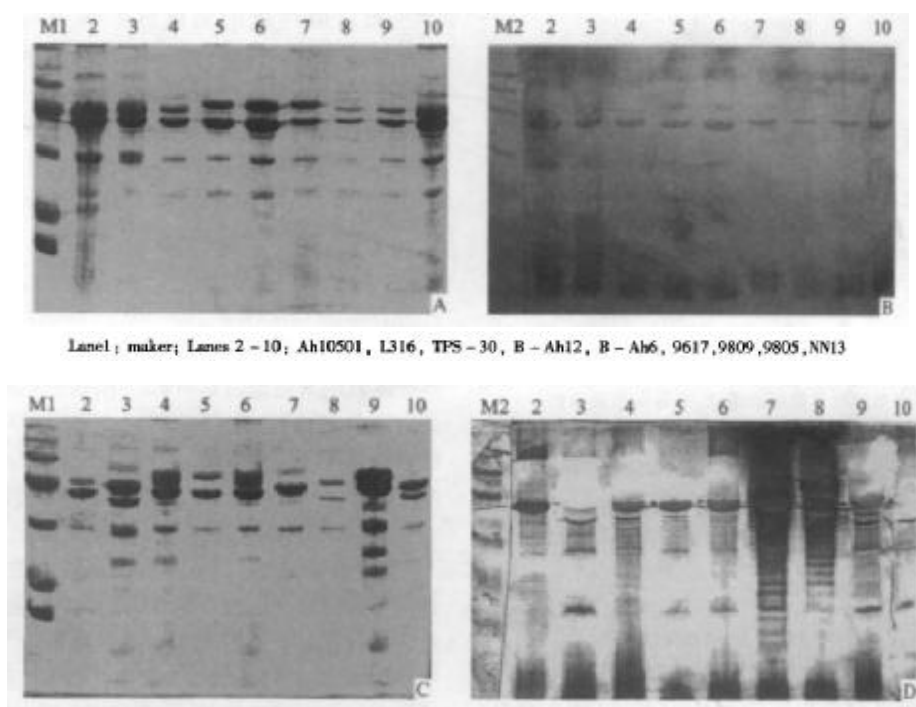
S层蛋白是嗜水气单胞菌表面的一种重要蛋白,被认为是重要的致病因子而受到重视<sup>[4-5,10-11]</sup>。绝大多数的S层蛋白是由单一的同源性蛋白质或糖蛋白组成,分子量为40~200 kD,而这种分子量上的差别是由蛋白质降解所致,部分是因为糖基化程度不同<sup>[14]</sup>。对表1所列20株典型气单胞菌进行处理,仅从嗜水气单胞菌ZY01-g3中提取到了大量的S层蛋白物质,与其外膜蛋白对应的位置能够找到该蛋白的存在。迄今为止,国外有关运动气单胞菌的报道仅限于血清型O:11的菌株<sup>[4,10]</sup>,其他常见优势血清型O:16、O:22和O:34都未有分离到S层蛋白。国内严亚贤等<sup>[15]</sup>则报道从嗜水气单胞菌J-1株等6株菌分离到S层蛋白。本研究中ZY01-g3的血清型不明,从实验结果来看,S层蛋白在气单胞菌的分布相当有限。

### 3.2 关于外膜蛋白

采用常用提取外膜蛋白的去污剂N-十二烷基肌氨酸盐结合超速离心分离了20株气单胞菌的外膜蛋白,在原有制备方法的基础上作了较大的改进,将常规提取方法的超速离心2次减至为1次,简化了提取程序又保证外膜蛋白的质量。考虑到细菌的外膜蛋白不仅限于这几种,因此,将采用该法获得的丰度较高的蛋白称为主要外膜蛋白(MOMP)。SDS-PAGE显示,40 kD、43 kD、50 kD和46 kD等4个蛋白条带含量丰富,出现频率高,是构成嗜水气单胞菌MOMP的主要部分。Quinn等<sup>[6]</sup>认为,嗜水气单胞菌40 kD和43 kD两条蛋白对于宿主的粘附有重要意义,其中40 kD是比较保守的孔蛋白(porin),该蛋白广泛地分布于多数气单胞菌,类似的报道还有最小弧菌*V. minicus* 39 kD的主要外膜蛋白<sup>[16]</sup>和鳃弧菌*V. anguillarum* 40 kD的孔蛋白<sup>[17]</sup>。43 kD的MOMP是另外一种重要且分布广泛的蛋白。最近,

Richa-Souza 等<sup>[8]</sup>证实豚鼠气单胞菌 *Aeromonas caviae* 43 kD 的蛋白是细菌定植宿主组织的主要粘附素。免疫印迹显示,上述蛋白带交叉反应强烈,具有相似

的免疫原性,是构成菌体抗原的重要部分,提示 MOMP 作为免疫原,以跨越传统的血清型障碍,实现对宿主动物的免疫防治具有潜在的应用价值。



Lane1: maker; Lanes 2-10: Ah10501, L316, TPS-30, B-Ah12, B-Ah6, 9617, 9809, 9805, NN13  
A-B 气单胞菌外膜蛋白电泳图谱及印迹图谱。C-D 气单胞菌外膜蛋白电泳图谱及印迹图谱。

A-B Coomassie blue-stained gel (A) and Western blot (B) of MOMP from different *Aeromonas* spp strains. C-D Coomassie blue-stained gel (C) and Western blot (D) of MOMP from different *Aeromonas* spp strains

图2 气单胞菌外膜蛋白电泳图谱及印迹图谱

Fig. 2 Coomassie blue-stained gel (A, C) and Western blot (B, D) of MOMP from different *Aeromonas* spp strains

### 3.3 外膜蛋白组与血清型间的关系

根据其中 19 株菌的 MOMP 主要蛋白区的电泳模型,可将其中的 14 株菌分为 3 个蛋白组(注:嗜水气单胞菌 B-2 的 MOMP 属 I 组,本文未显示图片; HB-405 的 MOMP 未测)。值得注意的是,该分组结果与以 LPS 为基础的血清学分型结果没有严格的相关关系,即不同菌株可能具有相同结构和免疫原性的脂多糖,但其外膜蛋白的形态和结构可能相差很远,反之,具有相同 MOMP 组的菌株,其 LPS 也可能没有任何关系。由于涉及的菌株比较有限,因此,应用主要外膜蛋白对嗜水气单胞菌进行归类还是一个尝试。Shideh 等<sup>[10]</sup>将 13 株 O:34 嗜水气单胞菌根据 OMP 的差异分为 3 个组,但其分组结果与本研究差别较大,除主观判断外,推测与外膜蛋白的制备

方法和研究的菌株有关。利用 OMP 型对细菌进行重新定位在大肠杆菌中也有应用,最近,高崧等<sup>[18]</sup>证实禽大肠杆菌的 OMP 是主要的保护性抗原, LPS 是次要的保护性抗原。以杀鲑气单胞菌 *A. salmonicida*<sup>[9]</sup>和嗜水气单胞菌<sup>[7]</sup>的外膜蛋白为基础的亚单位疫苗也显示出良好的免疫保护效果。至于 MOMP 亚单位苗能否突破传统的血清型障碍,实现对宿主动物的免疫防治,目前尚在研究中。

### 参考文献:

- [1] Alice Suk Yue Ho, Mietzner T A, Smith A J, et al. The Pili of *Aeromonas hydrophila*: Identification of an environmentally regulated Mini Pili[J]. Exp Med, 1990, 172:795-806.
- [2] Laller R. Antigenic differentiation of pili from non-virulent and fish-pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Dis,

- 1984,7:509-512.
- [3] Aguiar A, Merino S, Rubires X, et al. Influence of Osmolarity on lipopolysaccharides and Virulence of *Aeromonas hydrophila* Serotype O:34 Strains Grown at 37°C [J]. Infect Immun, 1997, 65(4): 1 245-1 250.
- [4] James S G Dooley, Mccubbin W D, Kay C M, et al. Isolation and Biochemical Characterization of the S-layer Protein from a Pathogenic *Aeromonas hydrophila* Strain [J]. Bacteriol, 1988, 170(6): 2 631-2 638.
- [5] 孙建和, 严亚贤, 陈怀育. 致病性嗜水气单胞菌保护性抗原的研究 [J]. 中国人畜共患病杂志, 1997, 13(3): 20-23.
- [6] Quinn D M, Max A H, Bretag A H, et al. Carbohydrate- Reaction, Pore-Forming Outer Membrane Protein of *Aeromonas hydrophila* [J]. Infect Immun, 1994, 62(9): 4 054-4 058.
- [7] Habibur M, Kawai Kenji. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish [J]. Fish Shellf Immun, 2000, 10: 379-382.
- [8] Richa-Souza C M, Colombo A V, Hirata R, et al. Identification of a 43-KDa outer-membrane protein as an adhesin in *Aeromonas caviae* [J]. Med Microbiol, 2001, 50: 313-319.
- [9] Peter L, Anrice M E, Oberter W H, et al. A conserve *Aeromonas salmonicida* porin provided protective immunity to rainbow trout [J]. Infect Immun, 1995, 63(8): 3 137-3 142.
- [10] Magdalena Kostrzynska, James S G Dooley, Takayuki Shimojo. Antigenic diversity of the S-layer protein from pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* Biotype *sobria* [J]. Bacteriol, 1992, 174(1): 40-47.
- [11] Kokka R P, Vedros N A, Janda J M. Electrophoretic analysis of the surface components of autoagglutination surface array protein-positive and surface array protein-negative *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* [J]. Clin Microbi, 1990, 28(10): 2 240-2 247.
- [12] Shideh Khashe, Warren Hill, Janda J M. Characterization of *Aeromonas hydrophila* strains of clinical, animal, and environmental origin expressing O:34 Antigen [J]. Clin Microbi, 1996, 33, 104-108.
- [13] 汪家政. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社. 2000.
- [14] Margit Sára, Sleytr U B. S-Layer protein, minireview [J]. Bacteriol, 2000, 182(4): 859-868.
- [15] 严亚贤, 陈怀育, 陆承平. 嗜水气单胞菌 S 蛋白的提纯及特性分析 [J]. 微生物学报, 1996, 36(2): 144-150.
- [16] Munitul Alam, Shin-Ichi Miyoshi, Ken-Ichi Tomochika, et al. Purification and characterization of novel hemagglutinins from *Vibrio mimicus*; a 39-Kilodalton Major Outer Membrane Protein and Lipopolysaccharide [J]. Infect Immun, 1996, 64(10): 4 035-4 041.
- [17] Michelle L D, Robert W H, Lucy M M. Influence of culture conditions on expression of the 40-Kilodalton Porin Protein of *Vibrio anguillarum* Serotype O2 [J]. Appl Envir Microbiol, 1998, 64: 138-146.
- [18] 高 崧, 吴晓东, 张 扬, 等. 禽大肠杆菌外膜蛋白、脂多糖疫苗的免疫保护试验 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(5): 457-459.

## Analysis of major outer membrane protein and S - layer protein of *Aeromonas hydrophila*

DONG Chuan-fu, LIN Tian-long, YU Fu-song, GONG Hui

(Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

**Abstract:** The major outer membrane proteins (MOMP) from nineteen strains of *Aeromonas hydrophila* and one strain of *Aeromonas sobria*, submitted to different O - serogroups, were prepared by treatment with 1.2% N - lauroylsarcosinate detergent combined with concentrating and purifying under ultracentrifuging. According to the SDS - PAGE patterns, the MOMP from the fourteen strains of tested bacteria were divided into three MOMP groups. Group I was comprised of 40 kD and 43 kD MOMP. Group II was comprised of 40 kD and 50 kD MOMP, and Group III was comprised of 40 kD, 46 kD and 50 kD MOMP. No close relationship was observed between MOMP groups and serotypes. The immunoblotting revealed that all the tested bacteria strains had strong positive reaction and the 40 kD MOMP occurred in most *Aeromonas* strains and was one of the main immunogenicity of somatic antigen of *A. hydrophila*. When the above bacterium cells were treated with 0.2 mol/L glycine hydrochloride (pH 4.0), only one *A. hydrophila* strain expressed abundant S-layer-like protein with molecular weight about 52 kD, but few typical S-layer-like protein was obtained from other predominant O-serogroups strains in this research.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*; serotypes; major outer membrane protein; S-layer protein

**Corresponding author:** LIN Tian-long. Tel: 86-591-7817514