

## 副溶血弧菌的外膜蛋白及其抗原性研究\*

张晓华 徐怀恕

(青岛海洋大学海洋生命学院, 266003)

Peter Robertson Brian Austin

(英国 Heriot - Watt 大学生物学系, 爱丁堡)

**摘要** 本文对 13 株不同来源的副溶血弧菌的外膜蛋白及其抗原性进行了比较研究。13 株副溶血弧菌的外膜蛋白有相似的 SDS - PAGE 图谱。大多数菌株有五条主要的蛋白质, 其大致分子量分别为: a、69kDa; b、63kDa; c、40kDa; d、30kDa; e、28kDa。其中蛋白质 b 是所有菌株共有的。与吸附后的兔抗副溶血弧菌血清 Western 印迹法结果显示抗血清与多数副溶血弧菌菌株的外膜蛋白有一条共同的免疫反应带, 其大致分子量为 44kDa。

**关键词** 副溶血弧菌, 外膜蛋白, Western 印迹法

副溶血弧菌是存在于近岸海洋环境的嗜盐细菌, 它常常因为污染海味食品而引起人类急性胃肠炎<sup>[6]</sup>。副溶血弧菌也是对虾细菌性疾病的重要致病因素之一<sup>[1, 11]</sup>。对副溶血弧菌抗原成份的了解, 是制备生物工程疫苗和建立可靠的血清学检测方法非常重要的基础。

革兰氏阴性菌暴露的表面成分如外膜蛋白和脂多糖与宿主直接接触, 在感染时介导着和宿主的相互关系, 在决定宿主免疫反应的特异性上起着重要作用<sup>[7]</sup>。目前已有许多关于副溶血弧菌的免疫学特性及其致病性研究。这些研究工作主要集中在对脂多糖的研究方面<sup>[3-5]</sup>。近些年, 一些学者对副溶血弧菌外膜蛋白的研究也越来越有兴趣<sup>[2, 7]</sup>。Western 印迹法是比较其它免疫诊断技术如 ELISA、FAT 和斑点印迹法更为特异的方法。它在诊断抗原前先将样品中的蛋白质进行初步的电泳分离。分离后能防止可能发生的交叉反应, 避免出现假阳性反应。

本文报告了副溶血弧菌外膜蛋白的制备技术及其 SDS - PAGE(十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳)图谱, 以及 Western 印迹技术对外膜蛋白抗原性的检测。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验菌株

收稿日期: 1997 - 01 - 20。

\* 本研究的主要工作在英国 Heriot - Watt 大学生物学系进行。

致谢: 感谢欧洲共同体“发展中国家生命科学和技术”计划的资助, 资助号为 STD<sub>3</sub>(TS3 - CT94 - 0269)。

副溶血弧菌菌株 457、458、459、460、461、462、463、611、612、797、798、799 和 800 来自英国 Heriot-Watt 大学生物学系(表 1)。

表 1 本研究所用菌株  
Table 1 Strains used in this study

细菌名称	Bacterial Species	菌号 Lab. code	来源 Source
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	457	LMG 12093
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	458	LMG 12094
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	459	Thailand, shrimp
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	460	Thailand, shrimp
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	461	Thailand, shrimp
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	462	Thailand, shrimp
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	463	Thailand, shrimp
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	611	ATCC 33844
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	612	ATCC 17803
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	797	China, shrimp
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	798	Thailand, shrimp
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	799	Thailand, shrimp
副溶血弧菌	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	800	Thailand, shrimp

## 1.2 免疫血清制备

将加热灭活的副溶血弧菌静脉注射免疫家兔制备抗体血清。并选择弧菌属不同的细菌及其它属的细菌共 52 株测定副溶血弧菌多价混合血清的交叉因素,用吸附法去除交叉因素\*。

## 1.3 外膜蛋白的制备

按改进的方法进行<sup>[9]</sup>。副溶血弧菌菌株接至 Marine Agar (DIFCO) 平板上,于 25℃ 培养 48h。将菌苔收集至 9ml PBS,振荡均匀。将细菌在 4℃ 离心洗涤三次(6000r/min, 15min),于波长 525nm 处读取菌液的 OD 值。若 OD 值大于 2.000,则能收集到足够的外膜蛋白。离心去上清液,向含沉积菌团的离心管中加入 2ml 含有 10mM EDTA 和 2mM PMSF (苯基甲基磺酰氟,蛋白酶抑制剂)的 PBS 并混匀,45℃ 水浴 30min,然后超声波处理 2min (DECON FS300)。将样品分装至小离心管,4℃ 离心 15min (Eppendorf, 14 000r/min)。仔细地取出上清液,-20℃ 保存。用 Bio-Rad 试剂(Bio-Rad 实验室, Munich)测定样品中的蛋白质浓度。将样品中加入三倍样品剂量的丙酮,在 -20℃ 保存 15min,然后 4℃ 离心 15min (14 000r/min)。仔细地去除上清液,加入不同体积的 SDS-PAGE 样品缓冲液使每个样品中含有相同的蛋白质浓度即 250μg/ml。

## 1.4 SDS-PAGE

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 12% (v/v),浓缩胶 4% (v/v)。每孔加 10μl 样品,在 150v 的恒压下电泳 1.5h。电泳结束后,采用考马斯亮蓝 R500 (Sigma) 染色,以商品化的低分子量标准蛋白 (Pharmacia) 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。

\* 张晓华、徐怀恕、许兵、纪伟尚、韩茵、杨学宋、马建康(1997);对虾弧菌病的间接荧光抗体诊断技术研究。海洋与湖沼,待刊。

### 1.5 Western 印迹法

SDS-PAGE 结束后,用转移仪(Hoefer 公司,美国)将凝胶上分离的蛋白质转移到孔径为  $0.45\mu\text{m}$  的硝酸纤维素膜(Sartorius 公司,德国)上,75v 的恒压下转移  $1.5\text{h}^{[10]}$ 。除所测样品外,用于 Western 印迹的胶中都含有预染色的 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白(Bio-Rad)。转移缓冲液中含有 25mM Tris,192mM 甘氨酸(pH8.3)和 20% 甲醇。转移结束后,将膜置于含有 3% 脱脂牛奶的 PBS 中  $4^\circ\text{C}$  过夜,封闭膜的未结合部位。将膜在 TTBS(含有 0.05% Tween 20 的 Tris 缓冲液)振荡洗涤两次,每次 5min。然后将膜在 1:1000(v/v)兔抗副溶血弧菌血清/0.1% 脱脂牛奶/PBS 中  $25^\circ\text{C}$  培养 1h。TTBS 中洗涤 3 次,每次 5min。再在 1:5000(v/v)的碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG(Sigma 公司, A-3687)/0.1% 脱脂牛奶/PBS 中  $25^\circ\text{C}$  培养 1h,TTBS 冲洗两次,TBS 冲洗一次(5min)。将膜中加入 3ml 碱性磷酸酶的底物 Western Blue (Promega 公司,美国)室温下培养 5-20min,使免疫反应蛋白带显色。然后用蒸馏水将膜洗涤两次,每次 5min,空气干燥。膜上免疫反应蛋白质的分子量用和 SDS-PAGE 同样的方法进行计算。



图1 13 株不同来源的副溶血弧菌外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱 菌株 612(A),797(B),798(C),799(D),800(E),457(F),458(G),459(H),460(I),461(J),462(K),463(L)和 611(M)。

Fig.1 SDS-PAGE of outer membrane proteins prepared from 13 strains of *Vibrio parahaemolyticus* grown in Marine Agar. Lanes: strains 612(A),797(B),798(C),799(D),800(E),457(F),458(G),459(H),460(I),461(J),462(K),463(L) and 611(M).



图2 吸附后的兔抗副溶血弧菌血清对 13 株不同来源的副溶血弧菌外膜蛋白的 Western 印迹。菌株 612(A),797(B),798(C),799(D),800(E),457(F),458(G),459(H),460(I),461(J),462(K),463(L)和 611(M)。

Fig.2 Western blotting of outer membrane proteins prepared from 13 strains of *Vibrio parahaemolyticus* grown in Marine Agar. Lanes: strains 612(A),797(B),798(C),799(D),800(E),457(F),458(G),459(H),460(I),461(J),462(K),463(L) and 611(M).

## 2 结果

### 2.1 SDS-PAGE 图谱

将 13 株不同来源的副溶血弧菌进行了 SDS-PAGE(图 1)。由图 1 可见,13 株副溶血弧菌的 SDS-PAGE 电泳图谱非常相似,大多有五条主要的蛋白质,其大致分子量分别为 a、69kDa;b、63kDa;c、40kDa;d、30kDa 和 e、28kDa。其中蛋白质 b 是所有菌株共同的,蛋白质 a 几乎也是所有菌株共同的(菌株 457 除外)。蛋白质 c、d 和 e 多数菌株有,但也有少数菌株没有。另外还有一些小的蛋白带如 44kDa。

## 2.2 Western 印迹

将 13 株副溶血弧菌的外膜蛋白进行 SDS - PAGE 后,用 Western 印迹法测定了吸附后的兔抗副溶血弧菌血清与外膜蛋白的免疫反应情况(图 2)。由图 2 可见,吸附后的兔抗副溶血弧菌血清与多数副溶血弧菌菌株有两条主要的免疫反应带,其大致分子量为 44kDa 及 28kDa。其中 44kDa 的免疫反应带是 11 株副溶血弧菌共有的(菌株 798、799 除外),且在考马斯亮蓝 R500 染色的胶中不是主要的外膜蛋白。吸附后的兔抗副溶血弧菌血清与菌株 799、800 只有极小的反应带。

## 3 讨论

Koga & Kawata 的 SDS - PAGE 显示<sup>[7]</sup>, 11 株副溶血弧菌的外膜蛋白有 4 - 6 条主要的蛋白质,其分子量为 22 至 44kDa,不同的菌株其主要蛋白质的数目及分子量有所不同。Biswas & chakrabarti 的 SDS - PAGE 显示<sup>[2]</sup>,副溶血弧菌的外膜蛋白的分子量范围为 14 到 102kDa。本文的结果表明,多数副溶血弧菌的外膜蛋白有 5 条主要蛋白质。在同种细菌中外膜蛋白的差别可能与细菌的培养条件、制备外膜蛋白的方法和菌株的不同有关<sup>[7]</sup>。许多学者的研究表明,细菌外膜蛋白的成分受培养基中的营养成分的影响<sup>[8,12]</sup>。副溶血弧菌不同菌株间外膜蛋白的差别可能与其血清型不同有关<sup>[7]</sup>。

人们观察到鼠抗副溶血弧菌多价血清与副溶血弧菌外膜蛋白有无数条免疫反应带<sup>[2]</sup>。本文用吸附后的兔抗副溶血弧菌血清与 13 株副溶血弧菌外膜蛋白反应,仅有 3 - 4 条免疫反应带,其中 44kDa 的免疫反应带几乎是所有副溶血弧菌菌株共有的(菌株 798、799 除外)。说明抗血清中副溶血弧菌与其它细菌的多数共同抗体已被除去,这大大增加了与副溶血弧菌反应的特异性。作者还用吸附后的抗血清与 3 株哈维氏弧菌的外膜蛋白进行反应,均未观察到 44kDa 蛋白质反应带。推测 44kDa 外膜蛋白可能与副溶血弧菌抗原的特异性有关,这当然尚需大量试验进一步证实。

血清学试验是诊断病原菌的快速有效的方法,但因病原菌和其它细菌存在共同抗原而出现交叉反应,常常导致假阳性。利用 Western 印迹法进行诊断,可直接观察到抗血清与特异性抗原的反应,就减少了假阳性的出现。另外,对病原菌的有效防治方法就是制备病原菌的疫苗。若能找出病原菌的特异性抗原,就可为提取疫苗的有效成份甚至制备生物工程疫苗创造条件。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 许兵等,1993. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究. 海洋学报,15(1):98 - 106.
- [ 2 ] Biswas T. & Chakrabarti M. K., 1994. Antigenicity and antigenic cross - reactivity of outer membrane proteins from *Vibrio parahaemolyticus*. International Journal of Medical Microbiology Virology Parasitology and Infectious Diseases. 281(4): 475 - 480.
- [ 3 ] Han, T. J. & Chai, T. J., 1991. Occurrence of 2 - Keto - 3 - Deoxy - D - manno - Octonic Acid in lipopolysaccharides isolated from *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology, 173(19): 6303 - 6306.
- [ 4 ] Han, T. J. & Chai, T. J., 1992. Electrophoretic and chemical characterization of lipopolysaccharides of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology 174(10): 3140 - 3146.
- [ 5 ] Iguchi, T. et al., 1995 *Vibrio parahaemolyticus* O serotypes from O1 to O13 all produce R - type lipopolysaccharide: SDS - PAGE and compositional sugar analysis. FEMS Microbiology Letters 130: 287 - 292.
- [ 6 ] Janda, J. M. et al., 1988. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio*

- Spp. Clin. Microbiol. Rev. 1:245 - 267.
- [ 7 ] Koga, T. & Kawata T., 1983. Isolation and characterization of the outer membrane from *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of General Microbiology 129: 3185 - 3196.
- [ 8 ] Koga, T. & Takumi, K., 1995. Siderophore production and outer membrane protein synthesis of *Vibrio parahaemolyticus* strain with different serotypes under Ironlimited condition. J. Gen. Appl. Microbiol. 41: 221 - 228.
- [ 9 ] Poxton, I. R., 1979. Serological identification of bacteroides species by an enzymelinked immunosorbent assay. Journal of Clinical Pathology 32:294 - 298.
- [10] Towbin, H. et al., 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76:4350 - 4354.
- [11] Vanderzant, C., et al., 1970. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Gulf coast shrimp. J. Milk Food Technol., 33(1):161 - 162.
- [12] Yamamoto, S. et al., 1995. Utilization of hemin and hemoglobin as iron sources by *Vibrio parahaemolyticus* and identification of an iron - repressible hemin - binding protein. FEMS Microbiology Letters 128, 195 - 200.

## ANTIGENICITY OF OUTER MEMBRANE PROTEINS OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Zhang Xiao hua Xu Huai shu

(Ocean University of Qingdao, 266003)

Peter Robertson Brian Austin

(Heriot - Watt University, Edinburgh, United Kingdom)

**ABSTRACT** The outer membrane proteins of 13 *Vibrio parahaemolyticus* strains from different sources have been compared. The overall profiles were similar. Most of the strains revealed five major proteins, designated a to e, with approximate molecular weights: a, 69kDa, b, 63kDa, c, 40kDa, d, 30kDa, e, 28kDa. Band b was detected in all strains. Immunoblotting with absorbed antisera to whole cells of *Vibrio parahaemolyticus* showed a strong antigenic response to protein 44kDa, which was not a major outer membrane protein, this was common to most strains examined.

**KEY WORDS** *Vibrio parahaemolyticus*, Outer Membrane Protein, Western Blotting