

不同类型抗菌素对致病性鳃弧菌外膜蛋白表达的影响

公衍军, 陈吉祥, 杜 萌, 李爱娟, 李 筠, 张晓华

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:对已分离的1株致病性鳃弧菌 W1 外膜蛋白图谱进行 SDS-PAGE 分析, 并与8株不同血清型的鳃弧菌外膜蛋白进行比较。结果表明, 鳃弧菌 W1 主要外膜蛋白分别为 24 kD, 38 kD, 42 kD 和 47 kD, 主要外膜蛋白图谱与鳃弧菌 O1 血清型标准菌株 VIB1 相似。抗生素药敏试验表明该菌对氨苄青霉素、强力霉素、磺胺嘧啶等14种常用药物产生了抗性, 只对新生霉素、呋喃妥因、利福平、新霉素等9种药物敏感。研究不同浓度的氨苄青霉素、强力霉素、磺胺嘧啶和庆大霉素对鳃弧菌外膜蛋白表达的影响。结果表明, 氨苄青霉素、强力霉素和磺胺嘧啶明显地抑制鳃弧菌 42 kD 的主要外膜蛋白的表达, 随着抗菌素浓度的增加, 该外膜蛋白的表达量逐渐减少甚至消失, 而庆大霉素浓度的变化对其表达没有明显影响。对该 42 kD 主要外膜蛋白进行 N 末端分析表明, 其 N 末端序列为 EAPTAINS, 与已发表的细菌其他外膜蛋白序列没有同源性。[中国水产科学, 2006, 13(5): 794-799]

关键词:鳃弧菌; 耐药性; 外膜蛋白; 表达

中图分类号: S941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)05-0794-06

鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 能引起世界范围内的多种海水、淡水养殖鱼类及其他养殖动物发生细菌病^[1], 是危害水产养殖动物健康的主要病原之一。近年来, 由于抗生素的大量使用, 细菌的抗药性越来越明显, 新的抗药性菌株不断出现, 增加了病害的防治难度。细菌的耐药机制主要与灭活酶和钝化酶的产生、主动外排、药物靶位点的改变以及药物渗透障碍等有关^[2], 而包括微孔蛋白 (porin) 在内的外膜蛋白对小分子亲水性营养物质和抗生素有良好的通透性^[3], 因而与细菌的致病性及耐药性有关。近年来不少作者报道革兰氏阴性菌外膜蛋白表达的下降或缺失与其耐药性有直接关系^[4-6]。

鳃弧菌外膜蛋白在细菌的致病过程中也有十分重要的作用, 如细菌侵袭、黏附、毒素的分泌、铁的摄取等方面, 同时也是该菌重要的保护性抗原^[7]。本研究对从山东沿海发病的鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 分离的鳃弧菌 W1 的外膜蛋白图谱进行分析, 与8株标准血清型鳃弧菌菌株进行比较, 研究了不同抗生素作用对鳃弧菌 W1 外膜蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株

鳃弧菌 W1 分离自山东海区发病的鲈鱼, 由本实验室保存^[8]。8株标准血清型鳃弧菌菌株由英国 Heriot-Watt 大学 Austin 教授提供。

1.2 鳃弧菌的抗生素敏感性试验

鳃弧菌接种至 2216E 斜面, 28℃ 恒温培养 24 h, 用灭菌生理盐水洗下, 涂布于 2216E 琼脂培养基平板, 无菌操作置入药敏片 (杭州天河生物制药厂), 28℃ 恒温培养 36 h, 测量抑菌圈直径大小, 根据说明书标准判断药物敏感和抗药性。

1.3 鳃弧菌外膜蛋白制备

鳃弧菌 W1 和标准菌株菌种接至 2216E 液体培养基, 28℃ 恒温振荡 (160 r/min) 培养 48 h。抗生素试验中鳃弧菌 W1 接种在含不同氨苄青霉素 (0 μg/mL, 75 μg/mL, 100 μg/mL)、强力霉素 (0 μg/mL, 75 μg/mL, 120 μg/mL)、磺胺嘧啶 (0 μg/mL, 75 μg/mL, 120 μg/mL) 和庆大霉素 (0 μg/mL, 75 μg/mL, 120 μg/mL) 浓度的 2216E 液体培养基, 28℃ 恒温振荡 (160 r/min) 培

收稿日期: 2005-12-22; 修订日期: 2006-03-01。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371108); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2003AA622070)。

作者简介: 公衍军 (1981-), 男, 硕士, 主要从事海洋病原微生物及免疫研究。

通讯作者: 陈吉祥, E-mail: betoon@ouc.edu.cn

养48 h,分别提取外膜蛋白。外膜蛋白提取参照Robert^[9]的方法,略有改动:低速离心(4 000 r/min)细菌培养物,收集菌体,用20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4,含10 mmol/L EDTA)缓冲液洗涤3次,置冰浴中超声波(600 W)破碎细胞10 min,以6 000 r/min,4℃离心30 min,收集上清液,经18 000 r/min离心1 h,弃上清,沉淀溶于含0.5%(w/v)十二烷基肌酸钠(Sackosyal)(Sigma,美国)的Tris-HCl缓冲液中,置37℃作用30 min,以18 000 r/min离心1 h,弃上清,然后用20 mmol/L Tris-HCl缓冲液洗沉淀2次,溶于双蒸水,置-20℃保存。蛋白浓度用Bradford法测定^[10]。

1.4 鳃弧菌外膜蛋白的SDS-PAGE电泳分析

参照Hames方法进行^[11]。根据1.3中Bradford法对蛋白浓度的测定保证各蛋白上样量均相同。分离胶浓度12%,浓缩胶4%,考马斯亮蓝R-250(Sigma,美国)染色。凝胶用捷达8.0凝胶分析软件(捷达,江苏)进行分子量和各组分百分比分析。

1.5 鳃弧菌主要外膜蛋白的末端序列分析

鳃弧菌外膜蛋白样品在12%的SDS-PAGE进行电泳后,电转移至PVDF膜,考马斯亮蓝R-250染色,将42 kD的主要蛋白带切下,送至北京大学蛋

白测试中心,经Edman降解,用Applied Biosystems Procise 491(Applied Biosystems, U.S.A.)蛋白序列分析仪进行N末端序列分析,用(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行末端氨基酸组成同源性分析。

2 结果

2.1 鳃弧菌W1外膜蛋白SDS-PAGE分析

提取不同抗菌素浓度下的外膜蛋白,测定浓度后,均按25 μg/孔上样量进行SDS-PAGE分析。结果表明,鳃弧菌W1主要外膜蛋白分子量集中19 kD~83 kD之间,与8株标准血清型鳃弧菌外膜蛋白菌株图谱比较发现,W1主要外膜蛋白带型与O1血清型菌株VIB1相似(图1)。主要条带分子量分别为24 kD,38 kD,42 kD和47 kD(表1)。

2.2 鳃弧菌的耐药性分析

测定了鳃弧菌W1对27种抗菌药物的敏感性,其中对青霉素、苯唑青霉素、氨苄青霉素、先锋霉素IV、先锋霉素V、先锋霉素VI、链霉素、强力霉素、洁霉素、万古霉素、灭滴灵等14种常用药物有抗性,只对新生霉素、呋喃妥因、利福平、新霉素等9种药物敏感(表2)。

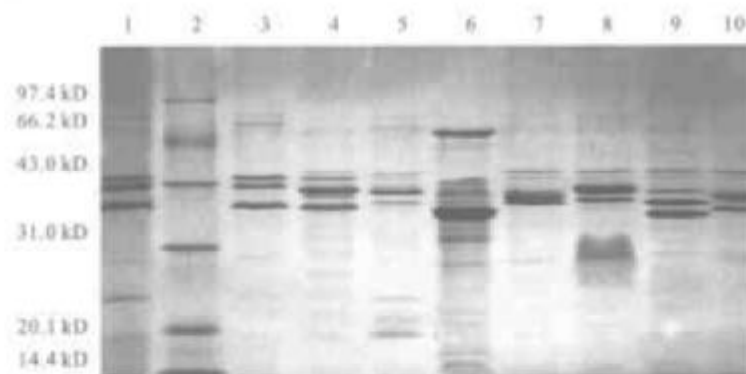


图1 W1外膜蛋白图谱及其与8株标准血清型菌株的比较

Fig.1 SDS-PAGE analysis of OMPs of W1 compared with 8 serotype strains

1: W1; 2: Marker; 3: VIB1; 4: VIB2; 5: VIB3; 6: VIB4; 7: VIB5; 8: VIB6; 9: VIB7; 10: VIB8

表1 鳃弧菌W1主要外膜蛋白分子量及组成

Tab.1 Molecular weight and percentage of each protein band in OMPs of *V. anguillarum* W1

项目 Item	条带 Bands							
	1	2	3	4	5	6	7	8
分子量/kD Molecular Weight	83	74	47	42	38	29	24	19
百分比/% Percentage	1.4	1.7	17.5	39.6	31.7	1.8	3.5	2.6

表2 鳃弧菌 W1 对抗菌药物的敏感性

Tab.2 The results of antibiotic susceptibility tests of *V. anguillarum* W1

药品名称 Antibiotics	剂量/ μg Dose (tablet)	抑菌圈直径/敏感性 Size of inhibition zone /Sensitivity
青霉素 Penicillin	10(IU)	0/R
苯唑青霉素 Oxacillin Sodium	1	0/R
氨苄青霉素 Ampicillin	10	0/R
先锋霉素IV Cefalexin	30	0/R
先锋霉素V Cefazolin Sodium	30	11.2/R
先锋霉素VI Cefradine	30	0/R
丁胺卡那 Amikacin	30	11.5/R
庆大霉素 Gentamycin	10	14.8/I
卡那霉素 Kanamycin Sulfate	30	15.0/I
链霉素 Streptomycin	10	0/R
妥布霉素 Tobramycin	10	18.0/S
新霉素 Neomycin	30	11/R
强力霉素 Doxycycline	30	0/R
萘啶酸 Nalidixic Acid	30	23/S
吡哌酸 Piperidic Acid	30	24.9/S
奥复星 Ofloxacin	5	32.8/S
氟哌酸 Fupisuan	10	23.6/S
丙氟哌酸 Ciprofloxacin	5	17/I
洁霉素 Lincomycin	2	0/R
万古霉素 Vancomycin	30	0/R
多粘菌素 B Polymyxin B	300(IU)	13.7/S
新生霉素 Novobiocin	30	24/S
磺胺嘧啶 Sulfadiazine	300	8.7/R
复方新诺明 Sinomin	27.75	23.9/S
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	30.1/S
利福平 Rifampin	52	3.1/S
灭滴灵 Metronidazole	5	0/R

注: S 表示敏感; R 表示抗性; I 表示中度抗性。

Note: S - sensitive; R - resistant; I - intermediate sensitive.

2.3 氨苄青霉素对鳃弧菌外膜蛋白表达的影响

氨苄青霉素对鳃弧菌主要外膜蛋白的表达的影响如图2所示,氨苄青霉素能明显抑制42 kD外膜蛋白的表达。随氨苄青霉素浓度升高,42 kD外膜蛋白表达量逐渐减少,当氨苄青霉素浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,该蛋白已基本不表达,而其他蛋白主要条带表达量基本不变(表3),但由于42 kD蛋白的大量减少导致其他蛋白占总量的百分比有所升高。

2.4 强力霉素对鳃弧菌外膜蛋白表达的影响

强力霉素能明显抑制42 kD外膜蛋白的表达,随强力霉素浓度升高,42 kD外膜蛋白表达量逐渐减少,当强力霉素浓度120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时其表达量百分比由不加抗生素时的36.7%降到1.1%,而其他蛋白条带表达量基本不变(图3,表3)。

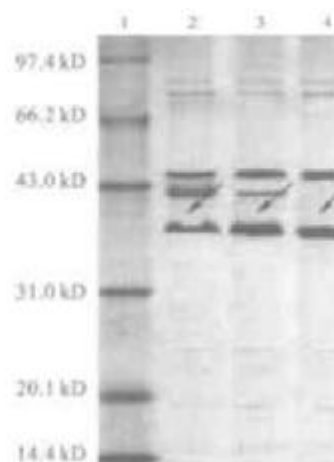


图2 鳃弧菌外膜蛋白表达图谱随氨苄青霉素浓度的变化

Fig.2 OMPs changes of *V. anguillarum* at different concentration of Ampicillin1: Marker; 2: 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3: 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 4: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

表3 鳃弧菌外膜蛋白各分子量条带百分比随抗生素浓度的变化

Tab.3 Percentage changes of each protein band in OMPs of *V. anguillarum* at different concentration of antibiotics

抗生素 Antibiotics	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Concentration	条带 Bands							
		1(83)	2(74)	3(47)	4(42)	5(38)	6(29)	7(24)	8(19)
氨苄青霉素 Ampicillin	0	2.9	3.6	19.2	38.7	32.2	4.7	1.2	3.5
	75	4.3	4.8	25.1	19.2	39.1	0	4.1	3.5
	100	6.7	7.1	29.6	0	45.3	0	5.6	6.0
强力霉素 Doxycycline	0	3.6	4.2	18	36.7	28.1	3.0	2.0	4.4
	75	2.5	3.5	25.6	16	42.3	5.4	1.7	3.0
	120	1.8	4.9	31.8	1.1	53.3	4.1	0	2.0
磺胺嘧啶 Sulfadiazine	0	1.9	3.1	16.3	37.8	30.2	4.6	2.4	3.8
	75	2.3	4.2	24.1	14.8	47	5.0	1.2	1.4
	120	2.1	5.1	26.8	2.6	53.7	6.0	1.0	1.3
庆大霉素 Gentamycin	0	2.7	3.4	19.5	36.6	30.7	4.5	1.8	2.6
	75	3.0	4.1	18.7	35.2	29.2	4.0	2.3	3.5
	120	2.4	3.9	20.5	30.7	32.6	3.7	3.0	3.2

注:括号中数值为该条带处的分子量。

Note: The figure in brackets is the molecular weight of this band.

2.5 磺胺嘧啶对鳃弧菌外膜蛋白表达的影响

磺胺嘧啶能明显抑制 42 kD 外膜蛋白的表达,随磺胺嘧啶浓度升高,42 kD 外膜蛋白表达量逐渐减少,对其他蛋白的表达没有明显影响(图 4,表 3)。

2.6 庆大霉素对鳃弧菌外膜蛋白表达的影响

庆大霉素对鳃弧菌外膜蛋白表达没有明显影响,随庆大霉素浓度的升高,鳃弧菌外膜蛋白各条带表达变化不大(图 5,表 3)。

2.7 鳃弧菌外膜蛋白的末端序列分析

对转膜后切取得到的 42 kD 蛋白经 Edman 降解,用 Applied Biosystems Procise 491 蛋白序列分析仪对其 N 末端进行了序列分析表明,其 N 末端序列为 EAPTAINS,经比对分析,该外膜蛋白的末端序列与已发表的细菌其他外膜蛋白序列没有同源性,推测其可能为鳃弧菌的一个特异性外膜蛋白。

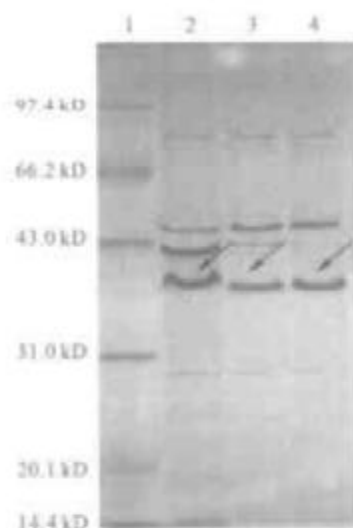


图3 鳃弧菌外膜蛋白随强力霉素浓度升高变化图谱

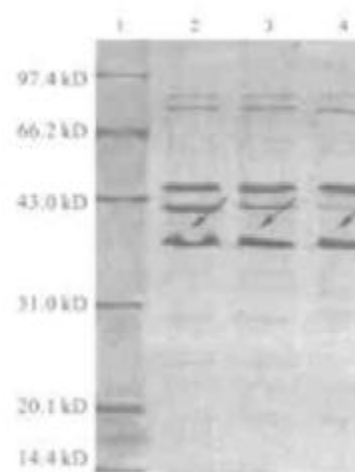
Fig.3 OMPs changes of *V. anguillarum* at different concentration of Doxycycline1:Marker;2:0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;3:75 $\mu\text{g}/\text{mL}$;4:120 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

图4 鳃弧菌外膜蛋白随磺胺嘧啶浓度升高变化图谱

Fig.4 OMPs changes of *V. anguillarum* at different concentration of Sulfadiazine1:Marker;2:0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;3:75 $\mu\text{g}/\text{mL}$;4:120 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

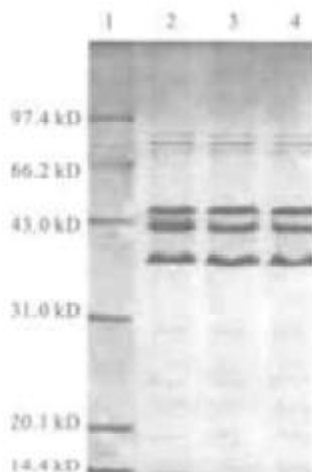


图5 鳃弧菌外膜蛋白随庆大霉素浓度升高变化图谱

Fig.5 OMPs changes of *V. anguillarum* at different concentration of Gentamycin

1: Marker; 2: 0 $\mu\text{g/mL}$; 3: 75 $\mu\text{g/mL}$; 4: 120 $\mu\text{g/mL}$.

3 讨论

鳃弧菌 W1 分离自中国山东沿海发病的鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*), 血清学分析表明属于 O1 血清型, 其主要外膜蛋白分别为 24 kD、38 kD、42 kD 和 47 kD, 对其外膜蛋白图谱的分析表明其外膜蛋白型与血清型一致, 即其外膜蛋白图谱与 O1 血清型菌株 VIB1 表现出了高度的相似。高崧等^[12]发现 OMP 型可以客观地反映细菌分离株的遗传相关性, 而目前普遍采用的 O 血清学分型则不能反映这一特性。相同血清型分离株其 OMP 型可以不同, 而不同血清型分离株其 OMP 型可能相同。Koga 等^[13]报道不同来源的甚至不同地区的同种菌株其外膜蛋白图谱均可有一定差异。药物敏感试验表明, 鳃弧菌 W1 对青霉素、苯唑青霉素、氨苄青霉素、先锋霉素 IV、先锋霉素 V 等常用抗生素均产生抗性, 而只对新生霉素、呋喃妥因、利福平、新霉素等 9 种药物敏感, 表明鳃弧菌 W1 已对大部分的药物产生了抗性, 可能与近年来大量使用抗生素有关。

细菌抗药性产生的机制复杂而多样, 其中外膜渗透性的改变是重要机制之一。外膜蛋白尤其是主要外膜蛋白 (Major outer membrane proteins, MOMP) 中的 porin 在介导营养物质运输、亲水性抗生素渗透等方面发挥重要作用, 微孔蛋白含量减少或丢失与青霉素、氨基糖苷类、 β -内酰胺类、四环素等产

生的耐药密切相关^[14-15]。本实验通过对鳃弧菌 W1 耐药性分析, 从鳃弧菌对其有抗性的抗生素中分别选取青霉素类、氨基糖苷类、四环素类和磺胺类药物, 分析了不同浓度抗生素对主要外膜蛋白表达的影响, 结果发现氨苄青霉素、强力霉素和磺胺嘧啶都能影响鳃弧菌 42 kD 主要外膜蛋白的表达, 而且随着抗菌素浓度的增加, 42 kD 外膜蛋白明显减少甚至消失, 推断该蛋白可能与抗生素进入细胞通道密切相关, 因为有报道指出, 外膜蛋白构成的三聚体通道是对外源分子选择性的一个重要决定因素, 当其数量减少或缺失时显然不利于抗菌药物对细菌发挥作用。而氨基糖苷类的耐药性主要是膜电位损伤或脂多糖结构的变化导致药物的不完全转运, 主要通过非膜孔蛋白自身促进摄取^[16], 外膜蛋白构成的 porin 对其影响不大。本实验中氨基糖苷类的硫酸庆大霉素对于鳃弧菌 W1 外膜蛋白基本没有影响。这也表明该 42 kD 蛋白可能为微孔蛋白。该蛋白的 N 末端序列分析表明, 该蛋白的末端序列与已报道的细菌外膜蛋白的序列具有较大差异, 未能发现与此相似的外膜蛋白, 该蛋白的性质及其在鳃弧菌耐药机制如何, 有待于进一步研究去揭示。

参考文献:

- [1] Toranzo A E, Santos Y, Lemos M L, et al. Homology of *Vibrio anguillarum* strains causing episcoties in turbot, salmon and trout reared on the Atlantic coast of Spain[J]. *Aquaculture*, 1987, 67: 41-52.
- [2] 张水利, 万顺亮. 细菌耐药性研究进展[J]. *中国医药杂志*, 2004, 12(5): 1 721-1 722.
- [3] 赵香波, 杨汉春. 细菌外膜蛋白的研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 1997, 23(12): 41-42.
- [4] Epp S F, Phecherre J, Kok M, et al. Raising antibodies against OprD, an outer membrane protein of *Pseudomonas aeruginosa* using translational fusions to MalE[J]. *J Microbiol Meth*, 2001, 46 (1): 1-8.
- [5] Speciale A, Musumeci R, Blandino G, et al. Molecular mechanism of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* to Fluoroquinolones[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2000, 14(2): 151-156.
- [6] Thomas L D, Kyd J M, Bastin D A, et al. Immunisation with non-integral OMPs promotes pulmonary [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 37(3): 155-160.
- [7] 周 丽, 刘洪明, 故文斌, 等. 鳃弧菌、溶藻弧菌外膜蛋白的分离及特性[J]. *中国水产科学*, 2003, 10(1): 31-35.
- [8] 肖 慧, 李 军, 徐怀超, 等. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病病原的研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 1999, 29(1): 89-91.

- [9] Robert E. Brennan, Richard E., et al. A simplified method for isolating outer membrane protein from *Pasteurella lyophilis* AI [J]. J Microbiol Meth, 1997, 29(3): 201 - 206.
- [10] Michael F. Jean-Francois J, Michalek M. Comparisons of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowery quantitation assays, using nonglycosylated and glycosylated proteins [J]. J Biochem Biophys Meth, 1992, 24: 265 - 274.
- [11] Hames B D. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach [M]. Oxford: Oxford University Press, 1990.
- [12] 高 磊, 段友玉, 蔡学忠, 等. 兔抗禽源大肠埃希氏菌 O78-g 分离株微孔蛋白抗体的制备与检测 [J]. 中国兽医学报, 1996, 2: 19 - 21.
- [13] Koga T, Kawata T. Characterization of the outer membrane from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Genet Microb, 1983, 129: 3 185 - 3 196.
- [14] 李 玲, 熊盛道, 徐勇健, 等. 铜绿假单胞菌外膜蛋白 O2 与耐药性关系研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(3): 190 - 191.
- [15] 贾 磊, 钱元超. 阴沟杆菌外膜蛋白通透性改变与其耐药性关系的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26(6): 194 - 197.
- [16] Bryan L E. 抗生素的耐药机理 [J]. 国外医药抗生素分册, 1990, 11(4): 284.

Effects of several antibiotics on expression of outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum* W-1

GONG Yan-jun, CHEN Ji-xiang, DU Meng, LI Ai-juan, LI Yun, ZHANG Xiao-hua

(College of Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: *Vibrio anguillarum* W1 is one of pathogenic strains isolated from diseased seaperch (*Lateolabrax japonicus*). Expression of outer membrane proteins (OMPs) was analyzed by Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The gel was quantitatively analyzed by JedaGel 8.0 professional gel analytic software. OMPs of *V. anguillarum* showed major proteins with sizes of 24 kD, 38 kD, 42 kD and 47 kD. The SDS-PAGE pattern was similar with that of *V. anguillarum* strain serotype O1 VIB1. Drug resistance tests showed that *V. anguillarum* W1 was resistant to 14 antibiotics such as Ampicillin, Doxycycline, Neomycin and Sulfadiazine, while sensitive to 9 antibiotics such as Novobiocin, Nitrofurantoin, Rifampin and Novobiocin. The effect of different concentration of Ampicillin, Doxycycline neomycin and Sulfadiazine were studied. Results showed that the 42 kD protein decreased or even lost accompanied with the increased concentration of Ampicillin, Doxycycline and Sulfadiazine. However, the increased concentration of Gentamycin had little effect on expression of outer membrane proteins in *V. anguillarum*. The N-terminal amino acid sequence of *V. anguillarum* W1 42 kD outer membrane protein suggested that its amino acid sequence is EAPTAINS. There are no similarities in N-terminal amino acid sequence with other bacterial membrane proteins. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 794 - 799]

Key words: *Vibrio anguillarum*; drug resistance; outer membrane proteins (OMPs); expression