

起始 pH 对嗜水气单胞菌溶血毒素的影响

汤伏生 曾 勇

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)

朱晓燕 郑清华*

(湖北农学院水产系, 荆州 434103)

摘 要 从患败血症鲫鱼病体分离到一批溶血毒素产生菌株, 对其中 5 株进行了致病实验, 对 4 株致病株进行了形态学和生化鉴定, 其中 CRI 14 与嗜水气单胞菌的特征吻合。进一步研究了培养起始 pH 对 CRI 14 株溶血毒素产生的影响, 用 SDS-PAGE 和 IEF 证明了酸性 pH (5.0) 能抑制至少两种嗜水气单胞菌胞外蛋白的表达。

关键词 pH, 嗜水气单胞菌, 溶血毒素, SDS-PAGE, IEF

嗜水气单胞菌引起养殖鱼类败血症暴发性流行, 曾给我国淡水养殖业造成巨大损失。1993-1994 年虽然没有大面积流行的报道, 但仍有部分池塘被该菌困扰。大量文献证明嗜水气单胞菌为条件致病菌, 引起养殖鱼类败血症的主要毒素是该菌的溶血毒素^[3]。但其致病条件究竟是什么, 目前还不是很明了。研究其致病条件, 对防治该菌引起的各类鱼病将是大有裨益的。

人们对病原菌的研究揭示了 pH 在毒素基因表达调控中起了重要作用。如霍乱弧菌 ToxR 调节子、鼠伤寒沙门氏菌的 pag 基因 (控制其在巨噬细胞内的生存)、根癌杆菌的 vir 基因 (控制细菌-寄主相互作用) 等基因都受 pH 调控^[12]。而对气单胞菌的 pH 效应, 研究还较少。Nomura 和 Saito^[11] 对杀鲑气单胞菌的溶血毒素产毒条件进行了部分研究, 证明培养基起始 pH 在 6.5-8.5 之间对毒素产生无影响。Majeed 和 MacRae^[10] 研究了低温 (5℃) 时 pH 对嗜水气单胞菌毒素产生的影响。朱晓燕等*测定了 pH 和碳源对鲤鱼肠道嗜水气单胞菌 CCF3 溶血毒素的影响, 证明酸性 pH 抑制溶血毒素基因表达。

本文从沙市郊区的池塘的患病鲫鱼中分离出一批气单胞菌菌株, 用比较不同起始 pH 培养条件的胞外蛋白产物的方法, 对培养起始 pH 对其溶血毒素产生的影响作了部分研究。

材 料 和 方 法

(一)试剂及缓冲液

电泳所用丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺及两性电解质均为 Bio-Rad 公司产品; 银染法

* 郑清华, 湖北农学院水产系 1992 级学生。

* 朱晓燕等, 1994。鲤鱼肠道嗜水气单胞菌及其产毒条件初步研究, 全国鱼类种质资源与生物技术研讨会。

所用硝酸银为分析纯试剂。

(二) 病鱼样品及菌株分离、致病实验、鉴定

患病鲫鱼为 1994 年 7 月从沙市水产技术推广站养殖池塘中捞取, 鱼体腹水严重, 鳍基部均有充血现象, 泄殖孔红肿, 病鱼均处于濒死状态。菌株分离和致病实验均按汤伏生等^[4]的方法进行。菌种鉴定按张纪忠^[5]。

(三) 溶血毒素活性测定

按朱晓燕等^{*}所用方法。

(四) SDS-PAGE 及 IEF

SDS-PAGE 按汤伏生和盛祖嘉^[2], IEF 按赵永芳^[6]。电泳完毕后用 Merril 法进行银染^[2]。

结 果 与 分 析

(一) 菌株分离

分别从病鱼肝胰脏、腹水、食物、肠壁、鳃及鳃粘液中分离出一批菌落, 菌落在 LB 培养基上均为浅黄色, 菌落表面湿润光滑, 与另文^{*}分离的 CCF3 具有相同的气味; 这批菌落可明显分成两类, 一类菌落较大, 而另一类较小, 大约为前者的 1/10 左右。挑取 5 个菌落进行致病实验, 结果见表 1。

表 1 致病菌株分离

Table 1 Isolation of pathogenic bacterial strains

菌株 strain	分离部位 isolating parts	菌落大小 size of colonies	急性致死时间 acute lethal time
IL 5	腹水	小	12 小时
IL 6	腹水	小	12 小时
CRI 14	肠壁	大	12 小时
GIL 16	鳃	大	36 小时

(二) 菌株鉴定

这 4 株菌均为革兰氏阴性; 氧化酶和触酶阳性; 甲基红试验、葡萄糖酸盐氧化试验和柠檬酸盐利用均为阳性; 均能还原硝酸盐; 均能分解酪素和淀粉, 卵磷脂酶阳性, 液化明胶; 产吲哚; 发酵葡萄糖、半乳糖和甘露糖均产酸产气; 均能在含 3.5% 的 LB 培养基中生长。厌氧硝酸盐产气均为阴性; 赖氨酸脱羧酶和精氨酸脱羧酶均为阴性, 均不能发酵 D-木糖和 L-山梨糖; 在含 5% NaCl 的 LB 培养基中不能生长。IL5 和 CRI14 为极生单鞭毛, 而 IL6 和 GIL16 为极生双鞭毛。这几株菌的其它相异特征见表 2。与 Farmer 等^[8]的描述相比, CRI14 与嗜水气单胞菌的特征最吻合。

(三) 培养起始 pH 对溶血毒素活性的影响

这 4 株菌溶血毒素活性都不高, 培养 8-36 小时时间内, 滴度均在 8-64 之间变化。当培养起始 pH 为 8.0 时, 培养 13 小时后离心取 80 μ l 培养液上清液与 4ml 1% 血反应 30

分钟。OD₅₇₅ 值是 0.1025; 而起始 pH 为 5.0 时则为 0.01, 没有溶血活性。但是不同 pH 对菌体生长却没有明显影响, 起始 pH8.0 时, OD₆₀₀ 是 3.443, pH5.0 时 3.281; 两者的终点 pH 也无明显差别, 分别为 8.58 和 8.44。

表 2 菌株鉴定

Table 2 Identification of bacterial strains

	IL 5	IL 6	CRI 14	GIL 16
由甘油产二羟基丙酮 Dihydroxyl pyruvate production from glycerol	+	+	-	+
果胶酶 pectinase	-	-	+	+
木聚糖酶 xylanase	-	-	+	+
三糖铁产酸 Acid production from TSI medium	+	+	+	+
三糖铁产 H ₂ S	-	-	+	+
H ₂ S production from TSI	-	-	+	+
发酵纤维二糖 Cellobiose fermentation	-	-	+	+
发酵阿拉伯糖 Arabinose fermentation	+	+	-	-
发酵七叶苷 Esculin fermentation	+	+	+	-

(四)毒素的初步纯化

用 50% 饱和度的硫酸铵对 1 升培养液上清进行分级沉淀后, 溶血毒素活性回收率为 27%。将沉淀毒素用 50mM 磷酸缓冲液溶解后对 1000 倍体积同样缓冲液透析四次后进行 DE-52 柱色谱, 用 0.1M, 0.2M 和 0.3M NaCl 进行阶段梯度洗脱, 溶血毒素活性集中在 0.2M NaCl 洗脱峰中, 但溶血活性回收率仅为 2%。可能是样品中蛋白浓度过稀, 导致酶失活。培养液上清、硫酸铵分级沉淀和 DE-52 柱色谱分级物的 SDS-PAG 电泳图谱见图 1。



图 1 溶血毒素初步纯化效果鉴定

Fig.1 Preliminary purification of hemolysin

1: CRI 14 培养液上清液; 2: 20% 硫酸铵沉淀; 3: 0-50% 硫酸铵沉淀; 4: DE-52 流出液; 5: 0.1 M NaCl 洗脱液 6: 0.2M NaCl 洗脱液; 7: 0.3M NaCl 洗脱液

(五) 培养起始 pH 对胞外蛋白组分的影响

将起始 pH 5.0 和 8.0 的培养液上清分别用 95% 硫酸铵沉淀, 将沉淀溶解在 SDS-PAGE 电泳的载样缓冲液里, 并对该 1000 倍缓冲液透析过液, 进行 SDS-PAGE 电泳, 凝胶浓度为 10%, 结果见图 2a。将样品对 IEF 起始缓冲液透析, 进行等电聚焦电泳, 聚焦 pH 为 4-6.3。结果见图 2b。

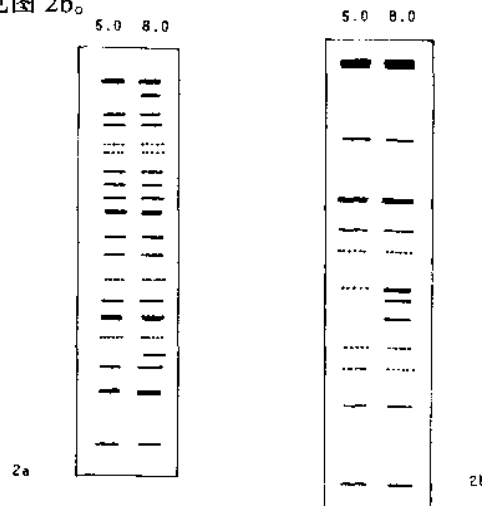


图 2 pH 对胞外蛋白组分的影响(示意图)

Fig.2 The influence of pH on extracellular proteins (diagram)

2a: SDS-PAGE; 2b: IEF

从图 2a SDS-PAGE 比较可看出, 起始 pH 为 8.0 的培养液上清中的蛋白带比 5.0 的多两条带。分子量较大的那条带, 正好与纯化毒素过程中 DE-52 柱层析所富集的带位置相同。在等电聚焦凝胶上 (图 2b), 起始 pH 8.0 培养液上清也比 5.0 上清多两条带, 这两条带的 pI 值在 5.0-6.0 之间。起始为 pH 8.0 时, 胞外蛋白比起始 pH 为 5.0 时多两种蛋白, 这两种蛋白是否就是溶血毒素或其相关因子, 还有待原位酶反应来证实。

讨 论

1. 培养起始 pH 对溶血毒素活性的影响

pH 可以从三个方面影响毒素活性: (1) 毒素在某一 pH 不稳定; (2) 某一 pH 抑制毒素活化酶 (胞外蛋白酶) 基因的表达; (3) 某一 pH 抑制毒素基因表达。

涂小林和陆承平^[7]认为嗜水气单胞菌溶血毒素在 pH 5.0-8.0 范围内基本稳定。Nomura 和 Saito^[11]将杀鲑气单胞菌的溶血毒素在 pH 6.0-9.0 范围内 4℃ 处理 12 小时, 溶血活性仍保留 50% 以上。本文不同起始 pH 培养 13 小时后, 终点 pH 均达 8.0 以上, 这与人结果一起证明酸性起始 pH 并不是通过使毒素失活的方式来影响毒素活性的。

Majeed 和 MacRae^[10]认为在 5℃ 情况下, 起始 pH 为 5.0 时嗜水气单胞菌不能生长, 起始 pH 为 5.5 时, 细菌生长缓慢, 但不产蛋白酶和脂酶, 在其培养液上清里也检测不到溶血毒素。本文所分离的嗜水气单胞菌 CRI 14 株在 pH 5.0 的起始条件下仍能生长,

且最后与其它起始条件者无明显差别,但是仍无溶血毒素活性。因本文尚未检测蛋白酶,所以还不能判断 pH 究竟是抑制胞外蛋白酶基因的表达还是抑制溶血毒素基因的表达。

2. 培养起始 pH 对胞外蛋白组分的影响

上面已排除了 pH 导致溶血毒素失活的可能性,那么在起始 pH 为 5.0 的条件下,溶血毒素和(或)蛋白酶基因的表达是否受抑制?本文通过 SDS-PAGE 和等电聚焦证实,起始 pH5.0 的培养液上清比 pH8.0 的蛋白带少两条。虽然我们的结果暂时还不能证实这两条带的功能,但可以推断它们在溶血过程中起了一定作用。

Karem 和 Foster^[9]研究 pH 对鼠伤寒沙门氏菌的调节时,发现碱性 pH (8.0) 抑制基因表达,酸性条件 (pH6.0) 下 DNA 解螺旋,基因开放。而气单胞菌溶血毒素基因却在偏碱性的条件 (7.0-8.5) 开放。这是否说明了病原菌与条件致病菌的不同,还有待人们对气单胞菌的进一步了解。

嗜水气单胞菌既能在寄主内营寄生生活,又能在环境中生存,是所谓典型的条件致病菌。当其感染到寄主体内时,它必然要经受 pH、渗透压及厌氧等环境压力的考验,它适应环境压力时,体内究竟发生了什么变化,这是一个非常有意义的研究问题。

参 考 文 献

- [1] 朱晓燕, 汤伏生, 1994. 健康家鱼肠道气单胞菌及其胞外酶分布. 湖北农学院学报, 14 (1): 35-39.
- [2] 汤伏生、盛组嘉, 1990. FD DNA多聚酶SDS-PAGE电泳后的原位酶反应, 武汉大学学报 (生物工程专刊): 57-60.
- [3] 汤伏生, 1994. 嗜水气单胞菌毒素研究, 湖北农学院学报, 14 (2): 1-8.
- [4] 汤伏生等, 1994. 家鱼肠道细菌和胞外酶对宿主及其消化的影响, 水产学报, 18(3): 177-182.
- [5] 张纪忠, 1990. 微生物分类学, 89-109. 上海: 复旦大学出版社.
- [6] 赵永芳, 1988. 生物化学技术原理及其应用, 346-355. 武汉大学出版社.
- [7] 涂小林、陆承平, 1992. 嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析. 微生物学报, 32 (6): 432-438.
- [8] Farmer, J.T. et al, 1992. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* in The Prokaryotes (Ed. by Albbert Balows et al). New York: Springer-Verlag: 3012-3045.
- [9] Karem, K. & J. W. Foster. 1993. The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 10(1): 75-86.
- [10] Majeed, K. N. & I.C.MacRae, 1993. Effect of pH levels on the growth and extoxin production by *Aeromonas* at refrigeration temperature. Microbios, 73: 281-288.
- [11] Nomura, S. & H. Saito, 1982. Production of the extracellular toxin by and isolated strains of *Aeromonas salmonicida*. Bull Jap Soc Fish. 48(12): 1589-1597.
- [12] Olson, E.R. 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. Mol. Microbiol. 8(1): 5-14.

INFULENCE OF THE INITIAL pH ON THE HEMOLYSIN ACTIVITY OF *AEROMONAS* *HYDROPHILA*

Tang Fusheng Zeng Yong

(Changjiang Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shashi 434000)

Zhu Xiaoyan Zheng Qinghua

(Dept. Fisheries, Hubei Agricultural College, Jinzhou 434103)

ABSTRACT A lot of strains of hemolysin producing bacteria have been isolated from the mortal goldfish (*Carassius auratus*) that had hemorrhagic syndrome. Five strains of this lot can kill healthy fishes when injected intraperitoneally. CRI 14 was convinced as a strain of *Aeromonas hydrophila* by morphological and biochemical identification tests. The influence of pH on the hemolytic activity of CRI 14 has been investigated. The results showed that the hemolytic activity could not be detected when the initial pH was 5.0. Subsequently, SDS-PAGE electrophoresis and isoelectric focusing (IEF) revealed that the initial pH 5.0 can repress the expression of at least 2 proteins.

KEYWORDS pH, *Aeromonas hydrophila*, hemolysin, SDS-PAGE, IEF