

海水养殖真鲷弧菌病病原菌外毒素的理化特性

吴后波 潘金培

(中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

摘要: 对最小弧菌 Vnr Pm 毒素的分子量、分子结构及氨基酸组分进行了测定, 同时还研究了温度、酸碱度及胰酶等因子对该毒素生物学活性的影响。研究结果表明, 该毒素为单一的多肽, 不具备典型的细菌毒素 A、B 亚基结构, 分子量为 30.456kD; 毒素蛋白含天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸及半胱氨酸等 15 种氨基酸, 其中天冬氨酸的含量最多, 半胱氨酸的含量最少, 酸性氨基酸含量为 26.6%, 碱性氨基酸含量为 14.4%, 疏水性氨基酸含量为 33.4%; 毒素活性的最适 pH 为 6—8, 对胰酶有抗性; 不耐热, 100℃ 下作用 1min, 其毒性完全消失, 而在 56℃ 下, 毒素完全失去活性需要 40min。

关键词: 真鲷弧菌病; 最小弧菌; Vnr Pm 毒素; 理化特性

中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)04-0409-04

弧菌病 (Vibriosis) 是我国南方沿海地区养殖真鲷 (*Pagrus major*) 中经常发生的主要细菌性疾病, 该病的爆发性流行给整个真鲷养殖业造成了巨大的经济损失, 近年来笔者对该病进行了一系列的研究, 在明确其病原菌是最小弧菌 (*Vibrio mimicus*) 的基础上, 对该病的病理、免疫防治^[1] 等进行了深入的研究, 特别是对病原菌最小弧菌致病机理的研究更是取得了重要的进展。已经证实真鲷弧菌病真正的致病因子是最小弧菌在致病的过程中产生的一种外毒素, 这种外毒素具有溶血性、细胞毒性和动物致死性等多种生物学活性, 该外毒素性质独特, 是最小弧菌产生的一类新的毒力因子, 作者将这种毒素命名为 Vnr Pm 毒素^[2]。为进一步弄清最小弧菌产生 Vnr Pm 毒素的环境调控机制, 在室内对培养条件如何影响 Vnr Pm 毒素的产生进行了模拟与探讨^[3]。此外, 还对 Vnr Pm 毒素的分子量、氨基酸组分等理化特性进行了研究。本文是有关 Vnr Pm 毒素理化特性的研究报道。

1 材料与方法

1.1 Vnr Pm 毒素的分离纯化 按吴后波等人^[2] 的方法进行。

1.2 Vnr Pm 毒素的分子量测定 将提纯毒素分别加入 5 倍电泳载样液 I (含 10% 巯基乙醇)、II (不含 10% 巯基乙醇), 沸水浴 2 min。采用 Laemmli 不连续 SDS-PAGE 系统, 浓缩胶为 2.5%, 分离胶为 10%, 室温下 30mA, 电泳 6—7h。待溴酚蓝指示剂接近底部时停止电泳, 用氨银法染色。

标准蛋白为低分子量的标准蛋白质, 含 6 种不同分子量的蛋白质成分, 它们的分子量分别为 97.4kD、66.2kD、43.0kD、31.0kD、20.1kD、14.4kD。

氨银染色液:

(1) 银氨溶液: 1.4mL 浓氨水, 1mL 7.56% NaOH 缓冲液加入 4mL 19.4% AgNO₃ 溶液, 待棕色沉淀消失后, 加蒸馏水至 100mL。

(2) 显色液: 0.005% 柠檬酸 0.019% 甲醛溶液。

1.3 Vnr Pm 毒素氨基酸组分分析 100μL 的提纯毒素用 2mL 6mol/L 的 HCl 110℃ 下消化 24h, 真空干燥后, 用蒸馏水定容至 1mL, 在日立 835-50 氨基酸自动分析仪上进行毒素蛋白的氨基酸组分分析。

1.4 温度对 Vnr Pm 毒素活性的影响 将提纯毒素在 56℃ 及 100℃ 分别处理 30s、1min、2min、5min、10min、30min、60min; 37℃ 处理 1、2、3、4、5 d, 1、2、3、4、5 周, 然后测其溶血价, 以未经温度处理的毒素作

收稿日期: 2003-12-03; 修订日期: 2004-01-06

基金项目: 中国科学院知识创新工程资助项目 (KSCX2-1-04); “十五” 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2003AA62050); 广东省“科技创新百项工程” 资助项目 (99B06201G)

作者简介: 吴后波 (1967—), 男, 湖北洪湖人; 博士, 副研究员; 研究方向: 海洋生物病害 E-mail: hh.w@netease.com

阳性对照。

1.5 pH 对 Vm Pm 毒素活性的影响 分别用 pH2.2 的碳酸氢钠-柠檬酸缓冲液, pH11.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, pH8.0 的 Tris-HCL 缓冲液调节提纯毒素的 pH 值, 使其 pH 值分别为 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 等, 于 37℃作用 1h 后, 用 1mol/L 的 HCL、1mo1/L 的 NaOH 将 pH 调回 7.0, 然后测其溶血价。用不经酸碱处理的提纯毒素作阳性对照。

1.6 胰酶对 Vm Pm 毒素活性的影响 用 0.25% 的胰酶, 按 1: 10(酶/毒素蛋白, W/W) 处理提纯毒素, 于 37℃作用 1h 后, 加入等体积 10% 的血清 MEM 液中和, 用 NCS-MEM 培养液作倍比稀释, 以提纯毒素为阳性对照, 测其溶血价。

1.7 溶血价的测定 提纯毒素用 50mmol/L 的 PBS 缓冲液(pH7.4) 在 96 孔板上倍比稀释, 然后加等量的 1% 的人红细胞, 于 37℃放置 1h, 再于 4℃放置 1h, 判断结果。以溶解 50% 红细胞的最高稀释度为溶血价。

2 结果

2.1 分子量测定 提纯毒素经载样缓冲液 I 及 II 沸水浴 2min 后, 采用 Laemmli 不连续 SDS-PAGE 系统进行电泳, 氨银法染色后皆显示出一条带(图 1)。电泳结果经科达电泳分析系统 120(Kodak electrophoresis Documentation and Analysis system 120) 进行分析, 测得该毒素的分子量为 30.456kD。由图 1 可知, 毒素经两种载样缓冲液处理后, 电泳均为单一的

一条带, 不具备典型的细菌毒素 A、B 亚基结构, 这表明该毒素为单一的多肽。

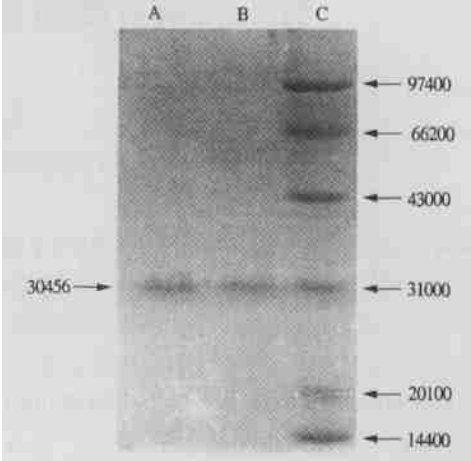


图 1 外毒素的 SDS PAGE 电泳(氨银法染色)
泳道 A 为载样缓冲液 I(含 10% 巯基乙醇)处理的毒素, 泳道 B 为载样缓冲液 II(不含 10% 巯基乙醇)处理的毒素, 泳道 C 为标准蛋白
Fig. 1 The SDS PAGE of the extracellular toxin(stained with silver stain reagent) Lane A, toxin reduced with 2 mercaptoethanol; Lane B, toxin not reduced with 2 mercaptoethanol; C, molecular weight marker proteins

2.2 氨基酸组分分析 提纯毒素被消化 24h 后, 在日立 835-50 氨基酸自动分析仪上进行毒素蛋白的氨基酸组分分析, 结果见表 1。该毒素蛋白含天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸及半胱氨酸等 15 种氨基酸, 其中天冬氨酸的含量最多, 半胱氨酸的含量最少。酸性氨基酸含量为 26.6%, 碱性氨基酸含量为 14.4%, 疏水性氨基酸含量为 33.4%。

表 1 毒素蛋白氨基酸组分分析
Tab. 1 Amino acid composition of the purified toxin

氨基酸种类 Amino acid	酸碱性 Acidity or alkalinity	摩尔分数 No. of residues/molecule	含量(%) Composition
天冬氨酸(Asp)	酸性	52	17.31
苏氨酸(Thr)	中性	20	5.67
丝氨酸(Ser)	中性	40	11.01
谷氨酸(Glu)	酸性	32	9.33
甘氨酸(Gly)	中性	13	3.98
丙氨酸(Ala)*	中性	26	7.01
半胱氨酸(Cys)	中性	2	0.33
缬氨酸(Val)*	中性	14	4.05
异亮氨酸(Ile)*	中性	22	6.06
亮氨酸(Leu)*	中性	28	7.65
酪氨酸(Tyr)	中性	16	4.55
苯丙氨酸(Phe)*	中性	18	4.90
赖氨酸(Lys)	碱性	36	9.85
精氨酸(Arg)	碱性	17	4.58
脯氨酸(Pro)*	中性	12	3.72

* 疏水性氨基酸

2.3 温度对毒素活性的影响 将提纯毒素在 56℃ 和 100℃ 分别处理 30s、1min、2min、5min、10min、30min、60min 后测其溶血价, 结果见图 2。由图 2 可知, 提纯毒素 100℃ 下 30s 其溶血价降到 4, 作用 1min, 其溶血能力完全失去, 即毒性完全消失, 而在 56℃ 下, 毒素完全失去活性需要 40min。

37℃ 处理后测其溶血价, 结果见图 3。由图 3 可知, 37℃ 的条件下毒素不可能完成失去其溶血性。

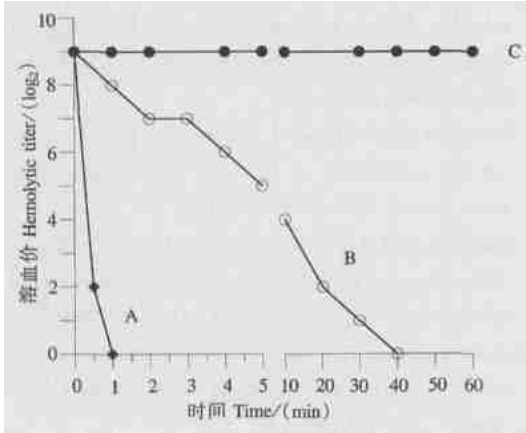


图 2 温度对毒素活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the toxin activities
A 表示 100℃ 处理; B 表示 56℃ 处理; C 为阳性对照

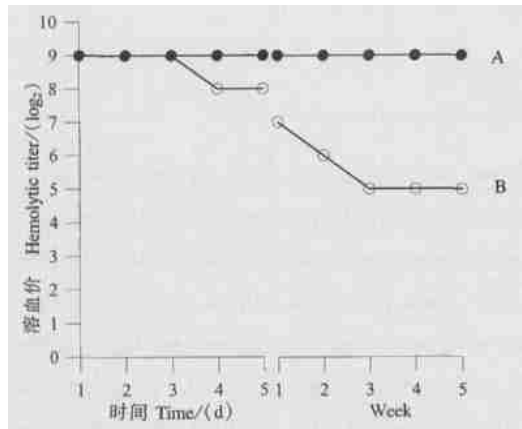


图 3 37℃ 处理对毒素活性的影响

Fig. 3 Effect of 37℃ on the toxin activities
A 表示阳性对照; B 表示 37℃ 处理

2.4 pH 对毒素活性的影响 提纯毒素在 pH 值分别为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 的条件下, 于 37℃ 作用 1h 后, 其溶血价变化如图 4, 可知保持毒素溶血能力的最适 pH 值的范围为 6—8。

2.5 胰酶对毒素活性的影响 用 0.25% 的胰酶, 按 1:10(酶/毒素蛋白, W/W) 处理提纯毒素, 于 37℃ 作用 1 h 后, 测其溶血价, 发现溶血价没有变化, 这表明该毒素对胰酶有抗性。

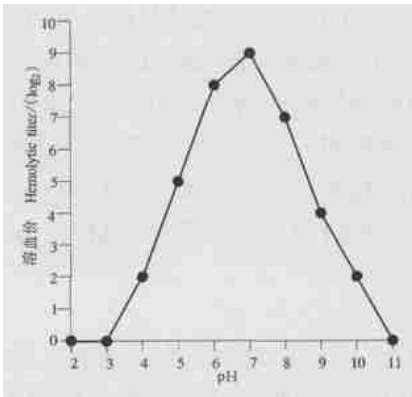


图 4 pH 对毒素活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on the toxin activities

3 讨论

通过分析纯化毒素的理化特性, 发现该毒素具有以下特点:

(1) 提纯毒素经 2 巯基乙醇处理, 作 SDS-PAGE 电泳, 获得一条带, 说明该毒素为单一的多肽, 不具备典型的细菌毒素的 A、B 亚基结构, 用该法测得其分子量为 30.456kD。

(2) 氨基酸组分分析的结果表明该毒素蛋白含天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸及半胱氨酸等 15 种氨基酸, 其中天冬氨酸的含量最多, 半胱氨酸的含量最少。酸性氨基酸含量为 26.6%, 碱性氨基酸含量为 14.4%, 疏水性氨基酸含量为 33.4%。

(3) 该毒素活性的最适 pH 为 6—8, 对胰酶有抗性。

(4) 不耐热, 提纯毒素 100℃ 作用 1min, 其毒性完全消失, 而在 56℃, 毒素完全失去活性需要 40min。

长期以来, 人们对最小弧菌的致病性研究一直是利用分离菌株对养殖动物进行各种方式的人工感染, 通过观察实验动物是否发病来判断最小弧菌的致病性, 而对疾病的发生、发展等过程缺乏深入的了解。由于对最小弧菌致病机理的研究最终将会为疾病的防治提供可靠的科学依据, 因此, 对致病机理的研究逐渐成为研究的重点和最活跃的研究领域。近年来的研究表明, 最小弧菌可以产生 2 种类型的溶血素, 一种类型是热稳定性溶血素^[4,5], 另一种类型是热不稳定性溶血素^[6,7], 此外还可以产生 2 种类型的肠毒素, 一种是热敏感性, 一种是热稳定性^[8]。

通过研究最小弧菌对养殖真鲷的致病机理, 不仅证明了 VmrPm 毒素是最小弧菌在致病过程中产生的真正致病因子, 而且还弄清了该毒素的生物学

活性及其产生的环境调控机制,此外,通过本文的研究,还弄清了该毒素的理化特性,这不仅丰富了最小弧菌致病机理方面的研究内容,进一步加深了人们对该菌致病机理的了解,而且,随着医学微生物学及分子生物学技术的不断发展,还将为进一步弄清该毒素的蛋白质结构、毒素基因的调控及表达等打下坚实的基础。

致谢: 本研究工作是在南京农业大学动物医学院院长陆承平教授亲自指导下完成,谨致谢忱。

参考文献:

[1] Wu H B, Pan J P. The immune protective effects of three kinds of vaccination against vibriosis in marine cage cultured red sea bream (*Pagrus major*) [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 2002, **26** (5): 457—464 [吴后波, 潘金培. 三种免疫制剂对真鲷弧菌病的免疫保护性. 水生生物学报, 2002, **26** (5): 457—464]

[2] Wu H B, Pan J P. Purification and characterization of the exotoxin Vnr Pm produced by *Vibrio mimicus* [J]. *Oceanologia et Limnologia sinica*, 2002, **33** (1): 83—89 [吴后波, 潘金培. 海水养殖真鲷弧菌病

病原菌外毒素的分离、纯化及生物学活性. 海洋与湖沼, 2002, **33** (1): 83—89]

[3] Wu H B, Pan J P. Effects of cultural conditions on the production of toxin by *Vibrio mimicus* [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 2003, **27** (1): 30—32 [吴后波, 潘金培. 培养条件对养殖真鲷弧菌病原菌毒素产生的影响. 水生生物学报, 2003, **27** (1): 30—32]

[4] Yoshida H, Honda T, Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin of *Vibrio mimicus* that relates to thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1991, **84**: 249—254

[5] Miyoshi S, Sasahara K, Akamatsu S, *et al.* Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio mimicus* [J]. *Infect. Immun.* 1997, **65**: 1830—1835

[6] Spira W M, Fedorka Cray P J. Purification of enterotoxins from *Vibrio mimicus* that appear to be identical to cholera toxin [J]. *Infect. Immun.*, 1984, **45**: 679—684

[7] Chowdhury M A R, Aziz K M S, Kay B A, *et al.* Toxin produced by *Vibrio mimicus* strains isolated from human and environmental sources in Bangladesh [J]. *J. Clin. Microbiol.*, 1987, **25**: 2200—2203

[8] Gyobu Y, Kodama H, Uetake H. Production and partial purification of a fluid accumulating factor of non-O1 *Vibrio cholerae* [J]. *Microbiol. Immunol.*, 1988, **32**: 565—577

THE CHARACTERISTICS OF THE EXOTOXIN Vnr Pm
PRODUCED BY *VIBRIO MIMICUS*

WU Hou Bo and PAN Jiu Pei

(South China Sea Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301)

Abstract: Toxin Vnr-Pm produced by *Vibrio mimicus* was purified in procedures as follows: salting out of ammonium sulfate, anion exchange chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration chromatography of Sephadex G100. The purified toxin Vnr Pm gave a single band with a molecular weight of 30.456kD following SDS-PAGE with or without β-mercaptoethanol, indicating that the toxin Vnr Pm did not contain inter-chain disulphide bonds in its conformation and was a single-chain polypeptide. Amino acid composition analysis demonstrated that the toxin protein contained fifteen different kinds of amino acids and revealed a comparatively higher percentage of acidic amino acids (26.6%) than alkaline amino acids (14.4%). Hydrophobic amino acids corresponded to 33.4% of total amino acid residues. The optimal pH for the toxin was 6—8 and resistant to trypsin. Heat treatment at 56℃ and 100℃ abolished the hemolytic activity of the toxin. The toxin completely lost its activity when incubated at temperatures of 56℃ and 100℃ for 40min and 1min, respectively. The toxin showed unique characteristics as compared with other known bacterial toxins.

Key words: *Pagrus major*; Vibriosis; *Vibrio mimicus*; Vnr Pm toxin; Characteristics