

温度对溶藻弧菌 HY9901株致病性相关蛋白的调控

庞欢瑛 吴灶和 简纪常 鲁义善

(广东海洋大学水产学院, 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室,
广东省教育厅水产经济动物病害控制重点实验室, 湛江 524025)

摘要: 将溶藻弧菌 HY9901 株置于 15℃、20℃、28℃、37℃四个温度下培养, 18h时分别测定细菌含量, 胞外蛋白酶 (Extracellular protease, ECPase) 表达量以及胞外产物 (Extracellular product, ECP) 对动物的致死性。结果表明, 随着温度升高, 菌液浓度、ECPase 的活性以及 ECP 对小鼠和红笛鲷的致死率先升高后下降。28℃培养的细菌浓度、ECPase 的活性以及 ECP 对小鼠和红笛鲷的致死率均为最大。用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析不同温度培养下细菌的 ECP 和外膜蛋白 (Outer membrane protein, OMP), 结果显示, 不同温度培养的溶藻弧菌 ECP 和 OMP 电泳图谱不同。溶藻弧菌主要 ECP 的分子量为 70 kD 和 62 kD。ECP 70 kD 在 20℃时的表达量最大, 而 28℃时 ECP 62 kD 的蛋白浓度最高。45 kD OMP 随着温度升高, 其合成量增大, 28℃时达最大值; 而 40 kD 和 34 kD OMP 则随着温度的升高而减弱。通过研究电泳纯化的 ECP 62 kD 和 ECP 70 kD 的酶活性和致死试验, 证明 ECP 62 kD 具有很强的酶活性和毒性, 而 ECP 70 kD 仅具有弱的酶活性和毒性。

关键词: 溶藻弧菌; 胞外产物; 外膜蛋白; 胞外蛋白酶; 温度

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)06-0787-07

溶藻弧菌广泛存在于海水中, 是海水养殖的重要致病菌之一。在导致海水养殖业重大经济损失的同时, 该菌还可以引起人类食物中毒、腹泻, 是颇受关注的一种人畜共患菌^[1]。大量研究表明致病性溶藻弧菌的胞外产物是引起养殖鱼类暴发性流行病死亡的致病因子, 其具有多种酶活性^[2-3]。溶藻弧菌的外膜蛋白在致病中起重要作用, 在疫苗研制中也占有特殊的地位^[4]。目前, 病原菌表达致病性相关蛋白的环境调控以及与调控有关的感觉信号已受到瞩目。温度作为环境因子的一个重要组成部分, 与细菌致病性相关蛋白的产生关系密切。关于温度对溶藻弧菌致病性相关蛋白的调控, 国内外还鲜见详细报道。本试验旨在研究温度对溶藻弧菌生长、胞外蛋白酶、ECP 对动物的致死性、ECP 和 OMP 的 SDS-PAGE 图谱的影响, 来进一步阐明溶藻弧菌的致病机理。

1 材料与方法

1.1 溶藻弧菌 (HY9901) 由本实验室分离鉴定并保存于本实验室。

1.2 细菌生长的测定 将溶藻弧菌接种于起始 pH 值为 7.2 的胰胨大豆胨液体培养基 (2% NaCl W/V) (TSB) 分别置于 15℃、20℃、28℃、37℃, 恒温振荡生化培养箱中 150 r/m in 培养 18 h, 取 1 mL 菌液适当稀释后 600 nm 下测 OD 值, 再对照细菌生长曲线换算成细菌数量。试验重复三次。用软件 SPSS 1.0 进行单因素方差分析, 用邓肯氏进行多重比较。

1.3 胞外产物的制备 参照文献 [3] 的方法略改动。细菌先采用胰胨大豆胨液体培养基 (TSB) 活化, 28℃下, 恒温振荡生化培养箱中 150 r/m in 培养 18 h, 然后取 1 mL 溶藻弧菌液涂布于铺有无菌玻璃纸的胰胨大豆胨琼脂 (TSA) (2% NaCl W/V) 平板培养基, 分别于 15℃、20℃、28℃、37℃ 下静置培养 18 h, 每皿中加入 4 mL pH 7.2 的 PBS 洗下菌液, 4℃下 10000 r/m in 离心 30 min。将上清液移到另一干净管, 细菌沉淀则用于 OMP 的提取。上清液经孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 获取溶藻弧菌胞外产物, 置 4℃ 冰箱保存。用紫外分光光度计测定样品中的蛋白质浓度。取适量样品稀释后, 分别测定

收稿日期: 2006-12-28 修订日期: 2007-11-25

基金项目: 广东省重大科技专项: “海水鱼类重大疾病疫苗及快速诊断”(编号: 2004A20401001)资助

作者简介: 庞欢瑛 (1980—), 女, 汉族, 广西北海人; 硕士; 主要从事水产经济动物病害的研究。E-mail: phying218@sina.com

通讯作者: 吴灶和, 博士, 研究员; Tel: 0759-236219; E-mail: wuh@gdou.edu.cn

波长 280 nm 和 260 nm 处的吸光值, 按公式: 蛋白质浓度 (mg/mL) = 1.45 OD₂₈₀ - 0.74 OD₂₆₀, 试验重复三次。用软件 SPSS 1.0 进行单因素方差分析, 用邓肯氏进行多重比较。

1.4 外膜蛋白的制备 参照文献 [5] 的方法并稍加改进。将材料与方法 1.3 中取完胞外产物的细菌沉淀分别于 4℃, 7000 r/min 离心 10 min, 重复洗 2 次, 用 PBS 悬浮细菌。冰浴条件下超声波破碎 7 min, 4℃, 7000 r/min 离心 15 min, 取上清。4℃, 35000 r/min 离心 1 h, 沉淀溶于十二烷基肌氨酸钠, 37℃ 作用 60 min, 然后 4℃, 35000 r/min 离心 1 h, PBS 收集沉淀即为外膜蛋白提取物, 测定蛋白含量, -20℃ 保存。试验重复三次。

1.5 蛋白酶的检测 参照文献 [6] 的方法略加改动。将 0.5% 酪氨酸蛋白 (Azocasein, Sigma 公司) 溶于 100 mL 的 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 8.0) 中, 取 100 μL Azocasein 和 100 μL 不同温度培养下提取的溶藻弧菌 ECP 混合, 用 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 8.0) 稀释至 500 μL, 37℃ 温育 30 min。加入 10% (W/V) 的三氯乙酸 400 μL, 室温放置 30 min 终止反应。13000 r/min 离心 5 min, 除去沉淀蛋白, 上清转移至一干净离心管中, 加入 800 μL NaOH (525 mmol/L) 显色, 测定 OD₄₄₂ 值。用煮沸 10 min 灭活的酶样品作为空白对照。用软件 SPSS 1.0 进行单因素方差分析, 用邓肯氏进行多重比较。

1.6 SDS-PAGE 按文献 [7] 的方法稍加修改, 采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳。以 12% 分离胶, 5% 浓缩胶, 每孔加样 ECP 或 OMP 20 μL, 蛋白含量约为 10 μg, 80 V 恒压电泳至溴酚兰进入分离胶后, 180 V 电泳直至指示剂迁移至接近胶底 1 cm 时停止电泳。取出凝胶考马斯亮蓝 G-250 染色, 用软件 Gel-Pro Analyzer 1.1 求出各分离蛋白质的分子量。

1.7 胞外产物的毒性作用

1.7.1 小鼠 (KM 昆明小鼠) 致死试验 小鼠购自广东医学院动物实验中心, 体重为 18—20 g, 雌雄各半。试验在室内进行, 将 50 只个体大小均匀的小鼠随机分成 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 暂养于 5 个规格为 30 cm × 15 cm × 15 cm 的笼中。试验期间, 温度为 (20 ± 3)℃, 相对湿度 40%—70%, 自然光照。待摄食和生长正常后, 开始正式试验。对照组注射 0.85% 无菌生理盐水, 每只注射 0.3 mL。试验组分别注射不同温度培养的溶藻弧菌的 ECP, 每只注射剂量为 0.3 mL。观察一周, 记录死亡时间和死亡数量。小鼠死亡后无菌操作采取脏器接种普通琼

脂平板, 观察有无细菌生长。

1.7.2 红笛鲷 (Lutjanus sanguineus Cuvier) 致死实验 红笛鲷购自湛江市南油网箱养殖鱼排, 平均体重为 10—15 g/尾。试验在海湾渔排网箱上进行。将 50 尾个体大小均匀的健康红笛鲷随机分成 5 组, 每组 10 尾。试验期间, 溶氧 6 mg/L 以上, 水温 (28 ± 2)℃, 盐度 24‰, 自然光照。待摄食和生长正常后, 开始正式实验。对照组注射 0.85% 无菌生理盐水, 每尾注射 0.2 mL。试验组分别注射不同温度培养的溶藻弧菌的 ECP, 每尾注射剂量为 0.2 mL。观察一周, 记录死亡时间和死亡数量。红笛鲷死亡后无菌操作采取脏器接种普通琼脂平板, 观察有无细菌生长。

1.8 ECP 主区带的研究

1.8.1 ECP 主区带的纯化 以 12% 分离胶, 5% 浓缩胶, 每孔加入 28℃ 或 15℃ 培养所获的细菌 ECP 30 μL, 80 V 电泳 1 h, 180 V 电泳 2 h, 电泳完毕后沿泳道方向纵向切下凝胶的一部分 (约 2—3 孔的宽度) 进行考马斯亮蓝 G-250 染色。其余未染色凝胶对照染色图谱准确切取含 70 kD 和 62 kD 的凝胶条带, 分别捣碎后用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 浸泡^[8]。4℃ 静置 3—4 d, 4℃, 7000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 紫外分光光度法测定蛋白质浓度。

1.8.2 ECP 主区带酶活性的检测 参照本文 1.5 的方法进行。用电泳纯化的 70 kD 和 62 kD 分别进行酶活性的检测。

1.8.3 ECP 主区带的致死性 参照本文 1.7 的方法进行。用电泳纯化的 70 kD 和 62 kD 分别进行小鼠和红笛鲷的致死试验。

2 结 果

2.1 培养温度对细菌生长的影响

培养温度对细菌生长的影响的试验结果 (图 1)。从图可见, 细菌在 15—37℃ 之间均可以生长, 在 28℃ 培养时产量最高。方差分析表明, 各培养温度的细菌含量差异不显著。

2.2 培养温度对细菌 ECP 总蛋白含量的影响

用紫外分光光度计测定样品中的蛋白质浓度, 结果发现随温度升高细菌 ECP 总蛋白含量先增加后减少 (图 2)。方差分析表明 15℃、20℃、37℃ 培养下, 细菌的 ECP 总蛋白含量与 28℃ 均有显著差异。

2.3 培养温度对细菌蛋白酶活性的影响

将提取的 ECP 用偶氮酪蛋白底物法测定蛋白酶活性, 结果如图 3 所示, 随温度升高酶活性先升高后下降, 28℃ 培养下细菌的胞外产物酶活性最高。

方差分析得出各个处理平均数间差异显著。

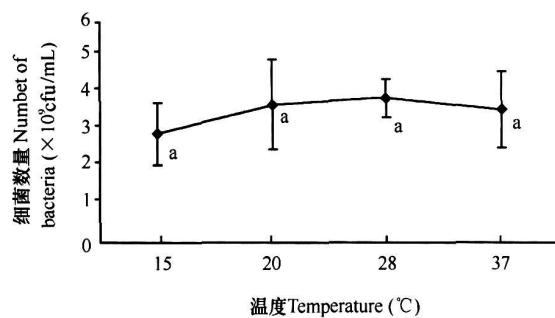


图 1 培养温度对细菌数量的影响

Fig. 1 Effect of cultural temperature on the number of bacteria

图中各数据点旁的英文字母表示 Duncan 氏多重比较结果,字母相同表示无显著差异,字母不同表示有显著差异($p < 0.05$),下图皆同。Letters show the results of Duncan's multiple range tests. The same letters mean no significantly different, and different letters mean significantly different ($p < 0.05$). Same as below

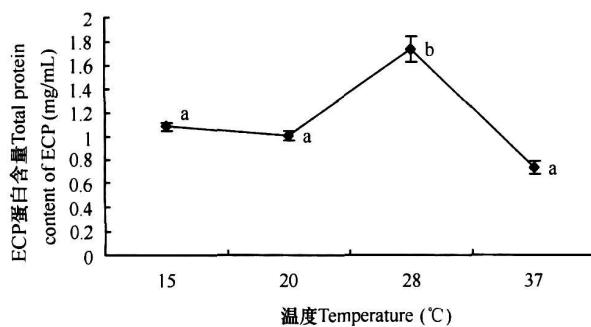


图 2 培养温度对细菌 ECP 总蛋白含量的影响

Fig. 2 Effect of cultural temperature on the total protein content of ECP

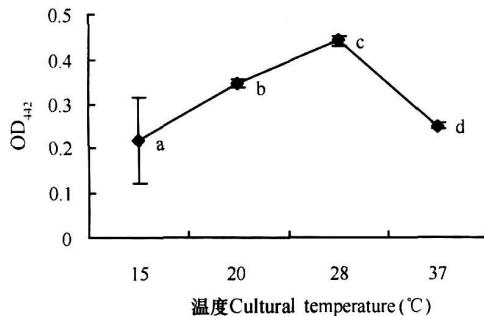


图 3 培养温度对细菌蛋白酶活性的影响

Fig. 3 Effect of cultural temperature on the poteolytic activity of ECP

2.4 ECP的 SDS-PAGE

经 SDS-PAGE 分析表明, 溶藻弧菌主要 ECP 的分子量为 70 kD 和 62 kD。15°C 培养时表达 70 kD 的蛋白带最多, 62 kD 条带几乎观察不到。ECP 70 kD 在 20°C 时的表达量最大, 而 28°C 时 ECP 62 kD 的蛋白浓度最高。37°C 无法观察到 70 kD 蛋白的表达, 62 kD 蛋白的表达也极其微弱。另外, 随着温度的升

高, 17 kD ECP 的表达量也增大(图 4)。

2.5 OMP的 SDS-PAGE

经 SDS-PAGE 分析表明, 不同温度培养下细菌的 OMP 电泳图谱属于同一模式, 均含有 45 kD、40 kD、38 kD、35 kD、34 kD 等 5 条主要 OMP 带。随着温度升高, 45 kD OMP 的合成量增大, 28°C 时达最大; 而 40 kD 和 34 kD OMP 正好相反, 随着温度的升高而减弱。OMP 35 kD 的合成量比较稳定(图 5)。

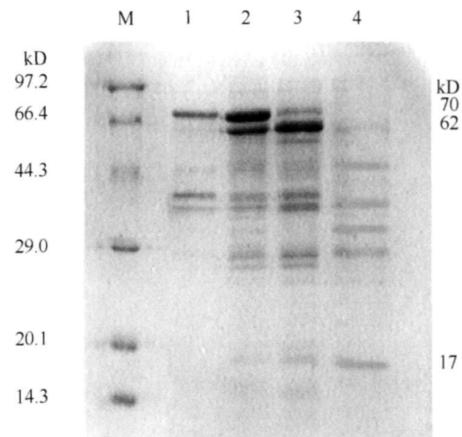


图 4 SDS-PAGE 分析不同温度培养下溶藻弧菌的 ECP

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of ECP from *V. alginolyticus* cultured in different temperatures

Lanes 1—4: 1. 15°C; 2. 20°C; 3. 28°C; 4. 37°C; M: 蛋白分子量标准
Molecular weight markers

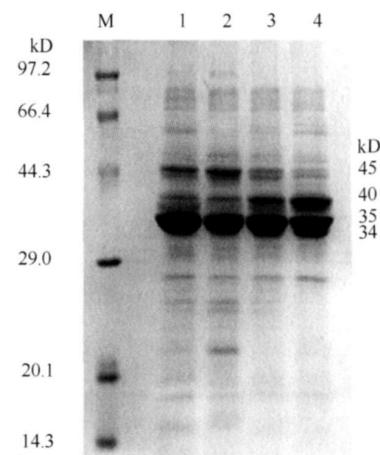


图 5 SDS-PAGE 分析不同温度培养下溶藻弧菌的 OMP

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of OMP from *V. alginolyticus* cultured in different temperatures

Lanes 1—4: 1. 37°C; 2. 28°C; 3. 20°C; 4. 15°C; M: 蛋白分子量标准
Molecular weight markers

2.6 ECP的致死实验

取不同温度培养的细菌胞外产物进行实验动物致死实验。结果发现: 小鼠注射了 ECP 后 3 h 开始

发病, 行动缓慢、反应迟钝、皮毛蓬松、厌食、弓背等, 4 h后开始死亡。如表 1所示, 20℃和 28℃的死亡率均为 100%, 37℃组对小鼠只有致病性没有致死性。

表 1 不同温度培养的细菌胞外产物对小鼠的致死实验结果^{*}Tab 1 Lethality of ECP of *V. alginolyticus* cultured in different temperatures^{*}

组别 Groups	试验小鼠数 (只) Total No. of mice used	小鼠死亡累计数量 (只) 及时间 No. of mice killed at (h)										死亡数 (只) Total No. of mice killed
		2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	18 h	24 h	48 h	
对照组 Control group	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15℃组 15℃ group	10	0	1	1	2	3	5	5	6	7	7	7
20℃组 20℃ group	10	0	7	10	10	10	10	10	10	10	10	10
28℃组 28℃ group	10	0	1	6	8	9	9	9	10	10	10	10
37℃组 37℃ group	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* 对照组: 腹腔注射 0.85% 无菌生理盐水 0.3 mL/只; 15℃组、20℃组、28℃组、37℃组: 分别腹腔注射于 15℃、20℃、28℃、37℃培养的溶藻弧菌的 ECP 剂量均为 0.3 mL/只

* Control group: 0.3 mL of 0.85% asepsis of physiology brine was injected intraperitoneally into each mouse. 15℃ group: 20℃ group: 28℃ group: 37℃ group: 0.3 mL of ECP of *V. alginolyticus* cultured in different temperatures was injected intraperitoneally into each mouse respectively.

表 2 不同温度培养的细菌胞外产物对红笛鲷的致死实验结果^{*}Tab 2 Lethality for *L. sanguineus* Cuvier of ECP of *V. alginolyticus* cultured in different temperatures^{*}

组别 Groups	试验红笛鲷数 (尾) Total No. of <i>L. sanguineus</i> Cuvier used	红笛鲷死亡累计数量 (尾) 及时间 No. of <i>L. sanguineus</i> Cuvier killed at (h)										死亡数 (尾) Total No. of <i>L. sanguineus</i> Cuvier killed
		2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	18 h	24 h	48 h	
对照组 Control group	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15℃组 15℃ group	10	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2
20℃组 20℃ group	10	0	0	2	2	6	6	6	6	8	8	8
28℃组 28℃ group	10	0	3	6	8	9	9	10	10	10	10	10
37℃组 37℃ group	10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2

* 对照组: 腹腔注射 0.85% 无菌生理盐水 0.2 mL/尾; 15℃组、20℃组、28℃组、37℃组: 分别腹腔注射于 15℃、20℃、28℃、37℃培养的溶藻弧菌的 ECP 剂量均为 0.2 mL/尾

* Control group: A 0.2 mL of 0.85% asepsis of physiology brine was injected intraperitoneally into each *L. sanguineus* Cuvier. 15℃ group: 20℃ group: 28℃ group: 37℃ group: 0.2 mL of ECP of *V. alginolyticus* cultured in different temperatures was injected intraperitoneally into each *L. sanguineus* Cuvier respectively.

2.7 ECP主区带的酶活性

将电泳纯化的 70 kD 和 62 kD 条带的蛋白含量均调至 1.0 mg/mL, 进行酶活性检测, 结果显示: 70 kD 和 62 kD 的酶活性分别为 0.15 ± 0.05 和 0.37 ± 0.02

表 2 显示随温度升高红笛鲷的死亡率先升高后下降, 28℃死亡率为最大, 37℃死亡率又下降到 15℃的水平。

2.8 ECP主区带的致死性

电泳纯化的 70 kD 和 62 kD 分别进行小鼠和红笛鲷的致死试验(表 3、表 4)。由表可知 62 kD 组的致死率远大于 70 kD 组。

表 3 ECP主区带对小鼠的致死实验结果^{*}

Tab 3 Lethality for mice of the major ECP

组别 Groups	试验小鼠数 (只) Total No. of mice used	小鼠死亡累计数量 (只)及时间 No. of mice killed at h											死亡数 (只) Total No. of mice killed
		2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	18 h	24 h	48 h	1 weeks	
对照组 Control group	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70 kD组 70 kD group	10	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
62 kD组 62 kD group	10	0	2	4	5	7	8	8	8	8	8	8	8

* 对照组, 腹腔注射 0.85% 无菌生理盐水 0.3 mL/只; 70 kD组、62 kD组, 分别腹腔注射电泳纯化的相对分子量为 70 kD 和 62 kD 蛋白, 剂量均为 0.3 mL/只

* Control group 0.3 mL of 0.85% asepsis of physiology brine was injected intraperitoneally into each mice. 70 kD group 62 kD group 0.3 mL of 70 kD and 62 kD protein was injected intraperitoneally into each mice respectively

表 4 ECP主区带对红笛鲷的致死实验结果^{*}
Tab 4 Lethality for *L. sanguineus* Cuvier of the major ECP

组别 Groups	试验红笛鲷数 (尾) Total No. of <i>L. sanguineus</i> Cuvier used	红笛鲷死亡累计数量 (尾)及时间 No. of <i>L. sanguineus</i> Cuvier killed at h											死亡数 (尾) Total No. of <i>L. sanguineus</i> Cuvier killed
		2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	18 h	24 h	48 h	1 weeks	
对照组 Control group	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70 kD组 70 kD group	10	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
62 kD组 62 kD group	10	0	0	2	2	6	6	6	7	7	7	7	7

* 对照组, 腹腔注射 0.85% 无菌生理盐水 0.2 mL/尾; 70 kD组、62 kD组, 分别腹腔注射电泳纯化的分子量为 70 kD 和 62 kD 蛋白, 剂量均为 0.2 mL/尾

* Control group 0.2 mL of 0.85% asepsis of physiology brine was injected intraperitoneally into each *L. sanguineus* Cuvier. 70 kD group 62 kD group 0.2 mL of 70 kD and 62 kD protein was injected intraperitoneally into each *L. sanguineus* Cuvier respectively

3 讨 论

环境因子对细菌致病性相关蛋白的调控是当前病原微生物研究中的一个热门课题, 目前已经达到分子水平。温度、盐度、pH 气体环境、铁及其他营养成分等诸多环境信号均可调节细菌致病性相关蛋白基因的表达^[9-10], 从而影响细菌的致病性。

Her^[11] 认为在细菌生长的稳定期, 当培养温度由 30℃ 升至 37℃ 并且在缺氧培养下溶藻弧菌胞外胶原酶和丝氨酸蛋白酶的产生就会受到抑制, 而在 37℃ 通风培养下蛋白酶的稳定性不受影响, 并且溶藻弧菌最佳生长温度是 33.5℃, 30℃ 和 37℃ 培养的生长率没有差别。本试验也显示温度在 15—37℃ 范围内对细菌生长的影响不显著, 但对细菌毒力具有显著的影响。15℃ 和 37℃ 培养下, 细菌的胞外酶的产生受到抑制, 毒性也下降。28℃ 培养的菌液浓

度、蛋白酶的活性以及 ECP 对动物的致死率均为最大, 显示溶藻弧菌 ECP 是一个受温度调控的毒力因子。溶藻弧菌于 28℃ 培养下 ECP 毒性最大, 这与夏季海水鱼暴发细菌性败血症的发病温度相符, 并且与李玉英等^[12]认为蟹源拟态弧菌最佳产毒温度为 28℃ 一致。这也提示我们 28℃ 可以作为灭活疫苗制备中优先选择的培养温度。

溶藻弧菌可产生多种胞外产物, 菌株不同, 实验条件不同所产生的胞外成分亦不同。Lee et al^[13] 报道溶藻弧菌能产生分子量为 33 kD 碱性丝氨酸蛋白酶, 而 Her et al^[14] 报道了溶藻弧菌能产生几种碱性丝氨酸蛋白酶, 分子量大约为 28 kD、22.5 kD、19.5 kD, 其中分子量为 28 kD 的碱性丝氨酸蛋白酶在 37℃ 时表达量下降。本研究的溶藻弧菌主要 ECP 的分子量为 70 kD 和 62 kD 与 Lee 和 Her 等发现的溶藻弧菌 ECP 分子量不同, 推测可能是由于菌

株不同,实验条件不同有关。本研究也发现细菌的ECP的分泌受到温度的调控,表现为:ECP 70 kD其表达量随温度升高而下降;37℃组的70 kD和62 kD蛋白的表达量均下降;20℃和28℃培养时可观察到清晰的62 kD条带。用电泳纯化的ECP 62 kD和70 kD蛋白做酶活性和致死实验,证明ECP 62 kD具有很高的酶活性和毒性,产生ECP 62 kD蛋白的基因值得进一步探讨。试验证明70 kD仅有弱的酶活性和毒性,为细菌在15℃培养时产生的主要毒力蛋白。

外膜蛋白位于革兰氏阴性菌细胞壁外,与外界直接接触,虽然还没有试验证明提纯的OMP有致病性,但有很多事例证明它与细菌免疫原性及物质转运均有关系。OMP作为基因表达的产物,它在一定程度上也受到介质中渗透压、温度、碳源等的影响。孙建和等^[15]报道温度影响嗜水气单胞菌OMP的表达,28℃培养时表达的OMP以43 kD者为最多;而37℃培养时表达最多的是38 kD的条带。本实验培养温度从15℃跨越到37℃,面对不同的温度环境,细菌采用改变自身代谢的方法来适应低温和高温,表现为:随着温度升高,增加外膜蛋白45 kD的表达,同时减少外膜蛋白40 kD和34 kD的表达。OMP 35 kD的合成量比较稳定,对温度变化不敏感,提示该蛋白具有重要功能,基因相对保守,可用作疫苗研制的候选蛋白。

参考文献:

- [1] Chen Q, Yan Q P. Progress on pathogenicity research of *Vibrio agglutinans* [J]. *Marine Sciences*, 2006, 30(8): 83—89 [陈强, 鄢庆枇. 溶藻弧菌致病性研究进展. 海洋科学, 2006, 30(8): 83—89]
- [2] Jin S, Zheng T L, Wang G L, et al. Pathogenicity of extracellular products of *Vibrio agglutinans* to *Gracilis* Yellow Croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Chin J Vet Sci*, 2004, 24(5): 439—441 [金珊, 郑天伦, 王国良, 等. 溶藻弧菌胞外产物对大黄鱼的致病性. 中国兽医学报, 2004, 24(5): 439—441]
- [3] Zuo F Q, Jian J C, Wu Z H. Characterization of extracellular products from *Vibrio agglutinans* isolated from maricultured fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(5): 51—55 [左风琴, 简纪常, 吴灶和. 鱼源溶藻弧菌胞外产物的特性研究. 水生生物学报, 2006, 30(5): 51—55]
- [4] Zhou L, Liu H M, Zhan W B, et al. Isolation and characteristics of major outer membrane proteins of aquatic pathogens *Vibrio agglutinans* and *Vibrio alginolyticus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(1): 31—35 [周丽, 刘洪明, 战文斌, 等. 鳗弧菌、溶藻弧菌外膜蛋白的分离及特性. 中国水产科学, 2003, 10(1): 31—35]
- [5] Wu Z H, Cao J X, Jian J C, et al. Effects of outer membrane protein of *Vibrio agglutinans* on *Penaeus japonicus* immunity [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2005, 24(6): 1—5 [吴灶和, 曹剑香, 简纪常, 等. 溶藻弧菌外膜蛋白对凡纳滨对虾免疫功能的影响. 热带海洋学报, 2005, 24(6): 1—5]
- [6] Henry J P, Windle D, Demot K, et al. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori* [J]. *Infect Immun*, 1997, 65(8): 3132—3137
- [7] Guo Y J. Protein electrophoresis experiment technology [M]. Beijing: Scientific Publishing House, 2001: 123—156 [郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 2001: 123—156]
- [8] Lin H Y, Chen S B, Song L Z, et al. Purification of major band outer membrane protein of *Vibrio Cholerae* EL-TOR [J]. *Microbiology*, 1995, 22(6): 358—360 [林厚怡, 陈慎宝, 宋兰珍, 等. 霍乱弧菌 EL-Tor35A 菌株外膜蛋白主区带的纯化. 微生物学通报, 1995, 22(6): 358—360]
- [9] Ma X Q, Lu C P, Chen H Q, et al. Effect of iron on virulent factors of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1998, 22(1): 83—86 [马向东, 陆承平, 陈怀青, 等. 铁对嗜水气单胞菌毒力因子的影响. 南京农业大学学报, 1998, 22(1): 83—86]
- [10] Chang X X, San Y W, Hai X R, et al. Proteomic analysis on the expression of outer membrane proteins of *Vibrio agglutinans* at different sodium concentrations [J]. *Proteomics*, 2005, 5: 3142—3152
- [11] Hare P, Long S, Robb F T, et al. Regulation of exoprotease production by temperature and oxygen in *Vibrio agglutinans* [J]. *Arch Microbiol*, 1981, 130: 276—280
- [12] Li Y Y, Li J N, Yu W Y. Selection of optimal producing condition of the exotoxin of *Vibrio minjicus* from *Erjochir sinensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(5): 468—473 [李玉英, 李槿年, 余为一. 蟹源拟态弧菌最佳产毒条件的筛选. 水产学报, 2003, 27(5): 468—473]
- [13] Kuo K L, Shu R Y, Peng C I. Alkaline aeropease is an exotoxin of *Vibrio agglutinans* in *Kuruma Prawn*, *Penaeus japonicus* [J]. *Journal of Current Microbiology*, 1997, 34(2): 110—117
- [14] Hare P, Scott, Burden T, Woods D R. Characterization of extracellular alkaline proteases and collagenase induction in *Vibrio agglutinans* [J]. *J Gen Microbiol*, 1983, 129(4): 1141—1147
- [15] Sun J H, Yan Y X, Chen H Q, et al. Effect of temperature on outer membrane protein (OMP) expression of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1999, 19(6): 555—558 [孙建和, 严亚贤, 陈怀青, 等. 温度对嗜水气单胞菌外膜蛋白表达的影响. 中国兽医学报, 1999, 19(6): 555—558]

REGULATION OF PATHOGENICITY ASSOCIATED PROTEIN BY TEMPERATURE IN VIBRIO ALGINOLYTICUS HY9901 STRAIN

PANG Huan-Ying WU Zao-He JIAN Ji-Chang and LIU Yi-Shan

(Fisheries College of Guangdong Ocean University, Guangdong Province Key Laboratory of Pathogen Biology and Epidemiology of Aquatic Economic Animals and Education Department Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025)

Abstract *Vibrio alginolyticus* is one of the most important opportunistic pathogens which exists extensively in seawater and causes diarrhea in human and vibriosis in cultured animals. The pathogenesis of *V. alginolyticus* disease is not clearly understood. In this article, the expression of some factors by *V. alginolyticus* HY9901 strain cultured in 15°C, 20°C, 28°C and 37°C was analyzed respectively. The effects of culture temperature on bacterial growth were studied on TSA media. Proteolytic activity of Extracellular protease (ECPase) were detected by the method of Azocase in Virulence of extracellular product (ECP) were studied by using Lethality form ice and *Lutjanus sanguineus* Cuvier. The results indicated that bacterial growth, proteolytic activity of Extracellular protease (ECPase) and virulence of ECP all enhanced firstly and then dropped as the temperature rising and 28°C was the optimum temperature. ECP and outer membrane protein (OMP) expression were studied by using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). It was suggested that the bacteria showed diverse ECP and OMP profiles under different cultural temperatures. The major bands of ECP for *V. alginolyticus* was 70 kD when the cells grown at 20°C, while 62 kD ECP at 28°C. 45 kD OMP became denser when the cells grown temperature was rising while 40 kD and 34 kD OMP became slight. The result also showed that SDS-PAGE purified ECP62 kD had strong proteolytic activity and Lethality for animals and SDS-PAGE purified ECP70 kD had weak proteolytic activity and Lethality for animals. These results suggested that a virulent factor of *V. alginolyticus* may be induced or enhanced under 28°C. The temperature regulated factors reported in this paper may be important in the pathogenesis of *V. alginolyticus* disease. The presented evidence also suggested that *V. alginolyticus* and possibly other bacteria destined for vaccine use in poikilothermic organisms should be cultured at temperatures consistent with that at which disease occurs.

Key words *Vibrio alginolyticus*; Extracellular product; Outer membrane protein; Extracellular protease; Temperature