

研究简报

## 溶藻弧菌脂多糖的化学成分分析及其对石斑鱼的毒性

叶剑敏<sup>1</sup>, 简纪常<sup>2</sup>, 吴后波<sup>1</sup>, 吴灶和<sup>2</sup>

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301; 2. 湛江海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

### CHEMICAL COMPOSITION OF LIPOPOLYSACCHARIDES(LPS) FROM VIBRIO ALGINOLYTICUS AND TOXICITY OF LPS ON EPINEPHELUS AKAARA

YE JianMin<sup>1</sup>, JIAN JiChang<sup>2</sup>, WU HouBo<sup>1</sup> and WU ZhaoHe<sup>2</sup>

(1. South China Sea Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301;

2. Fisheries College of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524025)

关键词: 石斑鱼; 溶藻弧菌; 脂多糖; 糖类; 脂肪酸; 毒性

**Key words:** *Epinephelus akaara*; *Vibrio alginolyticus*; Lipopolysaccharide; Sugar; Fatty acids; Toxicity

中图分类号: S965.334 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)05-0574-03

脂多糖(LPS)是大多数G<sup>-</sup>菌细胞壁的主要成分之一, 主要由多糖、类脂和蛋白质组成, 多糖具有抗原性。LPS属于TI抗原, 可直接激活机体的B细胞, 导致体液免疫应答, 因而LPS是一种较好的免疫保护剂, 能促进鱼体产生特异性的抗体, 提高鱼体的免疫力<sup>[1-3]</sup>。同时, LPS具有一定的毒性, 是构成G<sup>-</sup>菌内毒素的主要物质。对LPS的分离纯化和化学成分分析, 有助于对其结构的了解和利用LPS免疫保护性来预防鱼病的发生。Westphal和Jann对大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)<sup>[4]</sup>、Salati等对迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)<sup>[5]</sup>、陈昌福等对鱼害黏球菌C4(*Mycococcus piscicola* C4)<sup>[6]</sup>、Dalmo等对杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)<sup>[7]</sup>等鱼类病原菌的LPS进行了分离纯化和化学成分分析, 但对溶藻弧菌LPS的报道尚为鲜见。况且溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是引起海水鱼类弧菌病的主要病原菌之一, 能导致赤点石斑鱼患溃疡病而大量死亡, 造成巨大的经济损失。因此, 本文将对溶藻弧菌LPS进行分离纯化和其化学成分分析, 并研究其对石斑鱼的毒性, 为海水鱼类亚单位疫苗的研制提供理论依据。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 溶藻弧菌 本实验室从患溃疡病的赤点石斑鱼中分离

获得并保存。

1.2 石斑鱼 赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)购自广东大亚湾东山养殖场。40尾, 体重为40g—70g, 分养于2m<sup>3</sup>的4个海水池, 每池10尾, 实验期间每天投喂新鲜小杂鱼两次。

1.3 溶藻弧菌悬液的制备 溶藻弧菌在普通海水营养琼脂培养基上, 28℃下培养48h后, 5000r/min离心30min收集细菌, 然后用PBS(pH7.2)制成细菌悬液母液, 加入0.5%福尔马林, 4℃下过夜灭活。最后配成一定浓度的细菌悬液, 加入终浓度为0.01%乙汞硫代水杨酸钠或叠氮化钠, 存放于4℃冰箱中保存备用。

1.4 溶藻弧菌LPS的提取 溶藻弧菌LPS的提取按Westphal等修改的温酚法进行<sup>[4]</sup>。空冷冻干燥LPS后于4℃下保存备用。

1.5 LPS的化学成分分析 用蒸馏水溶解LPS冻干粉配制成1mg/mL的LPS溶液, 按Salati等的方法<sup>[8]</sup>对LPS的蛋白质、磷、糖类、脂肪酸及各种单糖的百分含量进行分析。

1.6 LPS脂肪酸成分的分析 把溶藻弧菌LPS溶入4mol/L NaOH溶液中, 在50℃下碱水解5h, 然后用醋酸酸化至pH2.0—2.5, 氯仿萃取后用甲醇HCl进行甲基化, 最后用气相色谱仪分析其脂肪酸成分。

收稿日期: 2004-12-24; 修订日期: 2004-04-15

基金项目: 中国科学院知识创新工程资助项目(KSCX2-F04); 863计划(2003AA622050)资助。

作者简介: 叶剑敏, 男(1976—), 硕士。主要从事水产动物疾病学的研究

通讯作者: 吴灶和, 研究员, 博导。主要从事水产动物疾病学的研究。

1.7 毒力测定 用 PBS (pH7.2) 将溶藻弧菌 LPS 配成 3.2mg/mL, 不去毒, 以此浓度作倍比稀释成 1.6mg/mL 和 0.8mg/mL。实验鱼分为 4 组, 每组 10 尾鱼。其中 3 组分别注射 3.2mg/mL、1.6mg/mL 和 0.8mg/mL LPS, 每尾鱼注射剂量为 0.3mL。另一组作为对照组, 注射等量无菌生理盐水, 连续观察 7d, 记录鱼的死亡数。

## 2 结果

## 2.1 LPS的化学成分及百分含量

LPS 约占提取物总量的 30%，其中粗蛋白质占 20.56%，磷占 0.94%，糖类占 4.8%，脂肪酸占 3.6%。在单糖中，戊糖占 1.15%，己糖占 2.85%，葡萄糖占 0.72%，半乳糖、6 脱氧己糖和 2-酮基-3-脱氧己糖 (KDO) 的含量均小于 0.1%。

## 2.2 LPS脂肪酸组分及百分含量

用气相色谱法测得LPS的脂肪酸共有6个峰(图1),峰1、2、3、5和6分别被判定为12'0、14'0、14'1、16'0和18'0,而峰4含有一个羟基,也为14'0。通过分析得知,峰1为十二碳烷酸,峰2为十四碳烷酸,峰3为十四碳烯酸,峰4为3'羟基十四碳烷酸,峰5为十六碳烷酸,峰6为十八碳烷酸。脂肪酸占LPS的3.6%,其中十二碳烷酸含量最高(2.80%),其次为十六碳烷酸(0.33%),十八碳烷酸(0.28%),而十四碳烷酸及十四碳烯酸均小于0.1%,3'羟基十四碳烷酸小于0.2%。

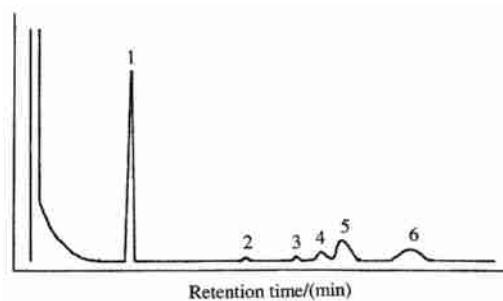


图 1 气相色谱法所测的溶藻弧菌脂多糖脂肪酸成分图

Fig. 1 Gas chromatogram of fatty acids of *V. alginolyticus* LPS

### 2.3 溶藻弧菌 LPS 对石斑鱼的毒性

LPS 对石斑鱼的致死性见表 1。从表 1 可知, 溶藻弧菌 LPS 石斑鱼具有一定毒性, 但毒性较低。当浓度为 3.2mg/ mL 和 1.6mg/ mL 时, LPS 对石斑鱼的致死率分别只有 40% 和 20%, 而 LPS 浓度低于 1.6mg/ mL 时对石斑鱼无毒性。

### 3 讨论

LPS 是大多数 G<sup>-</sup> 菌的成分, 由脂质 A、核心多糖和特异性多糖侧链组成。脂质 A 与核心多糖是通过 KDO 连接的。Wilkinson 和 Hisatsune 等认为弧菌属细菌 LPS 中不含有 KDO, 与其他革兰氏阴性细菌存在差异, 是弧菌属细菌的特征。Kenne 研究了霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 的 LPS 后也认为弧菌属 LPS 核心多糖部分与脂质 A 相连接的 KDO 位置被果糖所取代<sup>[10]</sup>。但本研究发现溶藻弧菌 LPS 内含有少量的 KDO (< 0.1%), 因此, 作者认为在溶藻弧菌 LPS 中, 部分 2 与脂质 A 连接的物质除了单糖外, 还有 KDO。

Salati 等对病海鱼弧菌和鳗弧菌 (*V. anguillarum*) 的研究后发现, 十二碳烷酸、十六碳烷酸和十八碳烷酸是病海鱼弧菌脂质 A 的主要成分; 而十四碳烷酸、十六碳烷酸和十八碳烷酸是鳗弧菌脂质 A 的主要成分。Salati 等又认为迟钝爱德华氏菌 LPS 的脂质 A 的主要成分是十四碳烷酸、3 羟基十四碳烷酸和十六碳烷酸<sup>[3]</sup>。本研究通过分析溶藻弧菌 LPS 的脂肪酸成分后, 认为十二碳烷酸 (2.80%)、十六碳烷酸 (0.33%) 和十八碳烷酸 (0.28%) 是溶藻弧菌 LPS 脂质 A 的主要成分, 这与病海鱼弧菌脂质 A 的主要成分一致, 与鳗弧菌的相似, 但与迟钝爱德华氏菌的不同。从而认为不同细菌属病原菌脂质 A 的主要成分存在一定差异。Kasper 等、Wilkinson 等认为十二碳烷酸是脂质 A 普遍存在的一种成分。本研究结果表明溶藻弧菌 LPS 中也含有十二碳烷酸, 且含量最高 (2.80%)。溶藻弧菌 LPS 脂肪酸成分中含有一种羟化脂肪酸即 3 羟基十四碳烷酸。Salati 等未发现病海鱼弧菌与鳗弧菌 LPS 脂质 A 脂肪酸中含有羟化脂肪酸, 而我们认为 3 羟基十四碳烷酸是溶藻弧菌脂质 A 脂肪酸成分中一种特征性的脂肪酸。

LPS 是 *G* 菌内毒素的主要成分, 具有一定的毒性, LPS 的毒性存在于脂质 A 部分。Ulevith 认为 LPS 会使鱼体出现中毒现象, 并可导致死亡。本研究结果表明溶藻弧菌 LPS 对石斑鱼具有一定的毒性, 可导致石斑鱼的死亡, 但 LPS 对石斑鱼的毒性不大, 当浓度为 3.2mg/mL 时, LPS 对石斑鱼的致死率也只有 40%。脂质 A 中未羟化脂肪酸是 LPS 具有毒性的原因, 且未羟化脂肪酸含量低的 LPS 毒性比未羟化脂肪酸高含量的 LPS 毒性低。溶藻弧菌 LPS 中脂肪酸的含量比迟钝爱德华氏菌、鱼害黏球菌<sup>[6]</sup>的低, 且含有少量的羟化脂肪酸即 3 羟基十四碳烷酸, 因此溶藻弧菌 LPS 对石斑鱼的毒性低, 且不是溶藻弧菌的主要毒力因子。

表1 溶藻弧菌LPS对石斑鱼的致死性

Tab. 1 The lethality of *V. alginolyticus* LPS on *E. akaaro*

## 参考文献:

- [ 1 ] Hastings T S, Ellis A E. Detection of antibodies induced in rainbow trout by different *Aeromonas salmonicida* vaccine preparations[ J ]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1990, **2**: 135—140
- [ 2 ] Lund V, Jorgensen T. Humoral immune response in Atlantic salmon, *salmo salar L.*, to cellular and extracellular antigens of *Aeromonas salmonicida*[ J ]. *Journal of Fish Diseases*, 1991, **14**: 443—452
- [ 3 ] Arnesen J A, Bjornsdottir R, et al, Immunological responses in Atlantic salmon, *salmo salar L* against purified serine protease and haemolysins from *Aeromonas salmonicida*[ J ]. *Journal of Fish Disease*, 1993, **16**: 409—423
- [ 4 ] Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol water and further applications of the procedure[ M ]. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1965, **5**: 83—96
- [ 5 ] Salati F, Kusuda R. Chemical composition of the Lipopolysaccharides from *Edwardsiella tarda*[ J ]. *Fish Pathology*. 1986, **20**(2): 187—191
- [ 6 ] Chen C F, Ji G L. Immune response of Grass carp against lipopolysaccharide of *Myxococcus pisciota*[ J ]. *Freshwater Fisheries*, 1989, **4**: 3—5. [ 陈昌福, 纪国良. 鱼害黏球菌 LPS 的提取及化学成分分析 [ J ]. 淡水渔业, 1989, **4**: 3—6 ]
- [ 7 ] Dalmo R A, Bogwald J. Distribution of intravenously and perorally administered *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide in atlantic salmon, *salmo salar L*[ J ]. *Fish and shelfish Immunology*, 1996, **6**: 427—441

## 作者更正

2003年7月出版的第27卷第4期第427页论文的中文和英文题目中、第430页论文的讨论3.2中的“rDNA 16S-23S”应改为“rDNA 18S-28S”。作者对由于自身的疏忽而给读者带来的不便深表歉意。

席贻龙

2004年5月30日