

研究简报

柱状嗜纤维菌的外膜蛋白和脂多糖及其对鳊的免疫原性

孙宝剑 聂 品

(中国科学院水生生物研究所; 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

OUTER MEMBRANE PROTEIN AND LIPOPOLYSACCHARIDE OF *CYTOPHAGA COLUMNARIS* AND THEIR IMMUNOGENICITY TO THE MANDARIN FISH, *SINIPERCA CHUATSI*

SUN Bao-jian and NIE Pin

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences; State Key Laboratory of
Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

关键词: 柱状嗜纤维菌; 外膜蛋白; 脂多糖; 鳊

Key words: *Cytophaga columnaris*; Outer membrane protein; Lipopolysaccharide; *Siniperca chuatsi*

中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)05-0524-04

柱状嗜纤维菌(*Cytophaga columnaris* Reichenbach)又名柱状屈挠杆菌(*Flexibacter columnaris* Leach better), 这种细菌感染几乎所有的淡水鱼类。柱状嗜纤维菌可造成严重的鳃和皮肤病变, 直至引起鱼的死亡^[1]。国内已经分离到多株柱状嗜纤维菌。外膜蛋白和脂多糖是构成革兰氏阴性菌表面抗原最主要的成分, 它们作为重要的保护性抗原而引起重视。鳊(*Siniperca chuatsi*)是我国名特优养殖的重要品种之一, 近年来各种病害的发生严重地影响其产量。而柱状嗜纤维菌是危害鳊的病原之一。本文旨在研究这种细菌的外膜蛋白和脂多糖的不同组分对鳊的免疫原性, 找出免疫原性最强的组分, 为今后的疫苗的研制提供参考。

1 材料与方 法

1.1 细菌的培养 菌株从患病鳊分离, 由华中农业大学陈昌福先生惠赠。细菌在 25℃ 条件下于粘细菌培养基中培养 48h, 然后离心 20min 集菌(1000r/min, 4℃)。

1.2 外膜蛋白的提取 外膜蛋白的提取按照 Nikaido 的方法^[2]进行。细菌用 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.2)清洗后, 悬浮于 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.2, 内含 DNase 和 RNase 1μg/mL, PSDF 50μg/mL)。超声波粉碎后, 离心 30min (1000r/min, 4℃), 弃去沉淀, 上清液超离心 1h (40,000r/min,

收稿日期: 2001-02-08; 修订日期: 2001-03-20

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(30025035); 淡水生态与生物技术国家重点实验室项目(2000FB02); 中国科学院院长基金(院基计字 750)

作者简介: 孙宝剑(1975—), 男, 山东临沂人; 在读硕士研究生; 主要从事鱼类免疫学研究

4℃)。加入 Sarkosyl 2% (v/v) 室温静置 30min, 溶解内膜蛋白; 超离心 1h (40,000r/min, 4℃) 得到外膜蛋白的沉淀。外膜蛋白-20℃保存。

1.3 脂多糖的提取 脂多糖的提取采用改进的酚-水抽提法^[3]。5g 细菌悬浮于 25mL 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0, 内含 5mmol/L EDTA), 超声波粉碎。加入 100mg 溶菌酶, 4℃搅拌过夜。然后 37℃温育 20min。加入 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0, 内含 5mmol/L EDTA, 20mmol/L MgCl₂) 至 100mL; RNase 和 DNase 加至终浓度 1μg/mL。悬液 37℃温育 60min, 60℃温育 60min。置于 70℃的水浴中平衡后, 加入相同体积的预热至 70℃的酚, 充分剧烈混合, 用冰水浴快速冷却 15min, 离心 15min (10,000r/min, 4℃)。弃去酚相, 水相用蒸馏水透析。真空干燥得到粗提物。粗提物溶于水, 离心 5min (1000r/min, 4℃) 弃去沉淀, 上清液超离心 2h (40,000r/min, 4℃) 即得到脂多糖。冻干保存。

1.4 免疫血清的制备 五尾鳊(平均体重 300g, 购自武汉牛山湖鳊鱼养殖场) 饲养于两个 250L 的水池中。免疫前驯化两周, 水温保持在 25℃。每尾鱼腹腔注射 200μL 福尔马林灭活的柱状嗜纤维菌(用相同体积的福氏完全佐剂乳化, 细菌浓度 1×10^9 个/mL)。两周后用相同剂量细菌(不完全佐剂乳化)加强免疫。两周后, 仅用相同剂量的细菌加强。一周后尾静脉采血, 室温静置 1h, 待其凝固后置 4℃冰箱中过夜。次日以 1000r/min 离心 10min, 收集上层血清, -20℃保存备用。

1.5 外膜蛋白和脂多糖的电泳和显色 电泳按 Laemmli 系统进行^[4]。浓缩胶浓度 4%, 分离胶 12%。100V 恒压电泳。外膜蛋白用 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 溶液(40% 甲醇-10% 乙酸配成)固定并显色, 7.5% 乙酸溶液(含 5% 甲醇)脱色。脂多糖的显色按 Tsai 的方法^[5]进行银染。

1.6 免疫印迹 电泳后, 用 Mini Protein II cell (Bio-Rad 公司) 将外膜蛋白和脂多糖转移至硝酸纤维素膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 Tween Phosphate Buffered Saline 室温封闭膜 1h。依次加入鳊鱼抗柱状嗜纤维菌血清 1:200; 兔抗鳊鱼 IgM 血清 1:200; 辣根过氧化物酶耦联的山羊抗兔 IgG 血清 1:100。各步骤之间用 0.05% Tween PBS 清洗 3 次, 每次 5min。DAB 为显色底物。

2 结果和讨论

在考马斯亮蓝显色的凝胶上, 可以识别出 11 种蛋白质, 其中 4 种蛋白染色较深, 它们的分子量分别为 24.4kd, 34.4kd, 47.5kd, 51.3kd; 7 种蛋白染色较浅, 它们的分子量分别为 29.6kd, 41.0kd, 58.6kd, 63.2kd, 70.2kd, 75.0kd, 85.7kd, 104.0kd。在免疫印迹膜上, 24.4kd, 58.6kd, 75.0kd, 85.7kd 的呈现较深的颜色, 尤其是分子量为 24.4kd 的蛋白, 呈现出深而宽的条带(图 1)。

在银染显色的凝胶上, 可以显现出 2 种脂多糖, 其中分子量约为 17.5kd 的条带染色深, 分子量约为 65.0kd 的条带染色较浅。在免疫印迹膜上, 17.5kd 的脂多糖表现出较强的免疫原性(图 2)。

24.4kd 外膜蛋白在 SDS-PAGE 上显示较深的条带, 由于免疫印迹的高度灵敏性, 可以认为 24.4kd 蛋白的免疫原性最强。条带较浅的 58.6kd, 75.0kd, 85.7kd 的蛋白也具有相对较强的免疫原性; 而 34.4kd, 47.5kd 的蛋白免疫原性却最低。在迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*) 菌的外膜蛋白中, 37kd, 40kd, 43kd 的蛋白具有较强的免疫原性, 而 97kd 的蛋白免疫原性较弱^[6]; 在爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*) 外膜蛋白中, 39kd 的外膜蛋白免疫原性最强^[7]。用鳊弧菌(*Vibrio anguillarum*) 免疫虹鳊鱼后, 外膜蛋白组分具有最强的刺激淋巴细胞增生的能力^[8]。另外研究表明, 外膜蛋白本身能够直接激活鱼类巨噬细胞, 而且还刺激白细胞产生一种巨噬细胞活化因子^[9]。

脂多糖是革兰氏阴性菌细胞壁和外膜的组分, 由 O-多糖侧链, 寡聚糖核心和脂 A 组成, 其中脂 A 包埋在细菌外膜的外侧。无论在凝胶还是在印迹膜上, 17.5kd 脂多糖染色深而且宽, 说明这类小分子的脂多糖含量多而且分子量上存在微小差异, 分子量上的差别主要由于 O-多糖侧链上多糖单位的不同。17.5kd 脂多糖免疫原性较强, 能够引起鱼体产生较多的抗体。现已证实, 用脂多糖浸泡鱼苗, 可以获得一定程度的免疫保护力^[10]。脂多糖作为保护性抗原在用弧菌疫苗免疫鳊的实验中 also 得到证实^[11]。

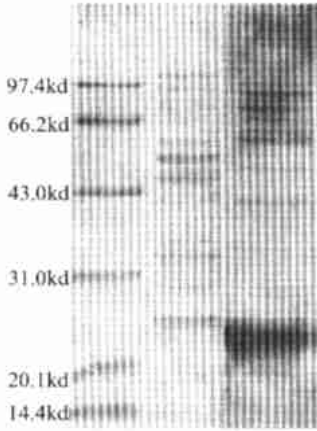


图1 柱状嗜纤维菌外膜蛋白的电泳及免疫印迹谱
Fig. 1 SDS-PAGE and Western Blot profile of the outer membrane protein of *C. columnaris*

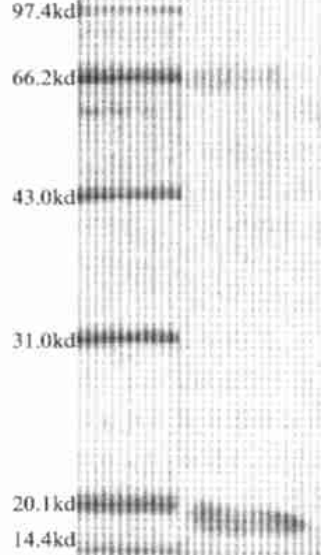


图2 柱状嗜纤维菌脂多糖的电泳及免疫印迹谱
Fig. 2 SDS PAGE and Western Blot profile of the lipopolysaccharides of *C. columnaris*

寻找保护性抗原成分或毒性因子,克隆其基因,通过载体在工程菌中大量表达,是设计基因工程疫苗的一种思路。本文仅找出免疫原性最强的组分,而柱状嗜纤维菌的感染与其很强的粘附特性相关,不同菌株之间其毒性可能存在差异。表面抗原与粘附因子,毒性因子的关系需待进一步探讨。

参考文献:

[1] Wakabayashi H. Columnaris Disease. In: Valerie I, Roberts R J, Bromage N R, eds. Bacterial Diseases of Fish [M]. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 1993. 23—40

[2] Nikaido H. Isolation of Outer Membranes. In: Patrik L C, ed. Bacterial pathogenesis [M]. London: Academic Press, 1997. 113—122

[3] Apicella M A, Griffiss J M, Schneider H. Isolation and Characterization of Lipopolysaccharides, Lipooligosaccharides, and Lipid A. In: Patrik L C, ed. Bacterial pathogenesis [M]. London: Academic Press, 1997. 123—133

[4] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T [J]. *Nature*, 1970, **227**: 680—685

[5] T'sai C M, Frasch C E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels [J]. *Analyt Biochem* 1982, **119**: 115—119

[6] Baldwin T J, Collins L A, Newton J C. Antigens of *Edwardsiella ictaluri* recognised by serum antibodies from naturally infected channel catfish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1997, **7**: 261—271

[7] Tu X L, Kawai K. Isolation and characterization of major outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda* [J]. *Fish Pathol*, 1998, **33**: 481—487

[8] Boesen H T, Pedersen K, Koch C. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to antigenic prepara

- tions from *Vibrio anguillarum* serogroup O1 [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1997, **7**: 543—553
- [9] Francis C H, Ellis A E. Production of a lymphokine (macrophage activating factor) by salmon (*Salmo salar*) leucocytes stimulated with outer membrane protein antigens of *Aeromonas salmonicida* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1994, **4**: 489—497
- [10] Dalmo R A., Kjerstad A A, Arnesen S M. Bath exposure of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk sac larvae to bacterial lipopolysaccharide (LPS): Absorption and distribution of the LPS and effect on fish survival [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, **10**: 107—128
- [11] Bogwald J, Stensvag K, Hoffman J, Holm K O, Jorgensen T O. Vaccination of Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., with particulate lipopolysaccharide antigens from *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1992, **2**: 251—256