

环境因子对鳃弧菌生长和胞外蛋白酶表达的影响

陈吉祥, 刘 斌, 池政豪, 李 筠, 张晓华

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 是一种水产动物的重要致病菌, 鳃弧菌分泌的胞外蛋白酶是该菌的致病因子之一。研究了环境因子对鳃弧菌 W-1 生长及胞外蛋白酶表达的影响。结果表明, 鳃弧菌的最适生长温度为 28℃, 菌体生长量在 21 h 达到最高, 胞外蛋白酶的活力在 24 h 最高。在 37℃ 培养时, 菌体生长和酶活力显著降低; 添加葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等碳源物质均能显著促进菌体的生长, 但对于胞外蛋白酶表达有明显抑制作用; 1 mmol/L EGTA 对菌体的生长和胞外蛋白酶表达没有明显影响, 而 1 mmol/L 的 EDTA 强烈抑制鳃弧菌的生长及其胞外蛋白酶的表达。添加不同浓度的氨苄青霉素对菌体的生长及其胞外蛋白酶表达有明显的抑制作用。

关键词: 环境因子; 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*); 蛋白酶; 表达

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3006 (2009) 01-0054-04

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是水产动物的一种重要的致病菌, 能引起世界范围内的淡水、海水鱼类及其他动物发生弧菌病, 常给水产养殖业造成巨大的经济损失^[1-2]。已发现鳃弧菌毒力因子有质粒编码的铁吸收系统、细胞外溶血毒素、细菌鞭毛蛋白等^[3-5]。胞外蛋白酶也是鳃弧菌的一种重要的致病因子, Inamura等^[6]从一株致病性O1血清型的鳃弧菌PT81049胞外产物分离纯化了一种金属蛋白酶, SDS-PAGE电泳分析酶的分子质量为 36 u, 该蛋白酶腹腔注射金鱼和小鼠的LD₅₀分别为 1.7 μg/g和 1.6 μg/g, Milton^[7]从鳃弧菌NB10克隆了金属蛋白酶基因, 编码 611 个氨基酸残基组成的多肽链, 完整蛋白的分子质量为 66.7 u。作者从山东沿海养鱼场发病鱼分离的致病性鳃弧菌W-1胞外产物中分离纯化了 1 种胞外蛋白酶, 对酶的理化性质研究表明, 该酶是一种金属蛋白酶, 纯化的酶注射鱼后能引起鱼的组织损伤和死亡, 该酶由 611 个氨基酸残基组成, 预测酶的活力中心氨基酸组成与霍乱弧菌、创伤弧菌等的酶活力中心相似^[8-9]。已知病原菌的生长及致病性跟其所处的环境密切相关, 其毒力因子的表达受体内外各种环境因子的影响, 作者研究了在体外培养条件下, 各种环境因子对鳃弧菌W1生长及胞外蛋白酶表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

致病性鳃弧菌W-1 分离自山东省莱州湾海区发病的花鲈(*Lateolabrax japonicus*), 经细菌形态学、生理生化及 Biolog 系统鉴定为鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)^[10]。

1.2 菌体培养及胞外产物的获得

鳃弧菌的培养采用 2216E海水液体培养基, 培养温度 28℃, 振荡频率为 180 r/min。培养物于 4℃ 10 000 r/min离心 10 min, 收集上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤去除残余菌体, 即得胞外产物。

1.3 菌体浓度、胞外产物蛋白含量及蛋白酶活力的测定

菌体浓度测定: 鳃弧菌培养物用生理盐水稀释后, 于 600 nm 波长下测定吸光值(A)。

蛋白质含量测定按 Bradford 方法进行, 以牛血清白蛋白为标准。

收稿日期: 2006-12-18; 修回日期: 2007-03-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371108); 国家 863 计划项目 (2003AA622070, 2007AA09Z416); 国家 973 计划项目 (2006CB101803)

作者简介: 陈吉祥 (1963-), 男, 甘肃武山人, 博士, 教授, 从事海洋微生物与免疫研究, 电话: 0532-82031561, E-mail: betcen@ouc.edu.cn

蛋白酶活力测定：参照Inamura方法^[6]，以偶氮酪蛋白为底物。在规定的条件下A值每增加 0.001 被定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.4 培养方法

1.4.1 温度对鳗弧菌生长和蛋白酶表达的影响

菌体接种于 2216E 海水培养基，分别在 15,28,37 ℃条件下培养，振荡频率 180 r/min，不同时间取样，在 600 nm 波长测菌体浓度，并测定蛋白酶活力。

1.4.2 碳源物质对鳗弧菌生长和蛋白酶表达的影响

2216E 海水培养基中添加 1%不同的碳源物质(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖)，在 28℃培养，不同时间取样，在 600 nm 波长测菌体浓度，并测定蛋白酶活力。另外，在培养基中添加不同质量分数的葡萄糖(0.1%,0.5%,1%,2%)，用相同的方法测菌体浓度和酶活力。

1.4.3 抗生素对鳗弧菌生长和蛋白酶表达的影响

在培养基中添加 10,50,100 mg/L 氨苄青霉素，在 28℃培养，不同时间取样，在 600 nm 波长测菌体浓度，并测定蛋白酶活力。

1.4.4 EDTA 和 EGTA 对鳗弧菌生长和蛋白酶表达的影响

培养基中分别添加 1 mmol/L 的 EDTA 和 EGTA，在 28℃培养，不同时间取样，在 600 nm 波长测菌体浓度，并测定蛋白酶活力。

2 结果

2.1 温度对鳗弧菌生长及胞外蛋白酶表达的影响

在 28 ℃条件下培养，菌体生长和蛋白酶活力最好，从 6~24 h 处于对数生长期,在 24 h 时菌浓度达到最大；同步检测了鳗弧菌分泌的胞外蛋白酶的活力，蛋白酶分泌与菌体生长基本同步，活性随着菌体的生长逐渐升高,并在 24 h 达最大分泌量，约 36 h 后缓慢下降（图 1）。15 ℃条件时菌体生长和酶活力都有一定降低，但差异不显著($P>0.05$)，在 37 ℃条件下，菌体的生长和胞外蛋白酶的表达均受到显著的抑制 ($P<0.05$)。

2.2 碳源物质对鳗弧菌生长和蛋白酶表达的影响

在培养基中分别添加 1%的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等不同碳源，在 28 ℃培养 24 h，结果发现添加 1%葡萄糖、蔗糖、麦芽糖均不同程度地促进菌体的生长,但对蛋白酶的分泌有一定的抑制作用（表 1）。

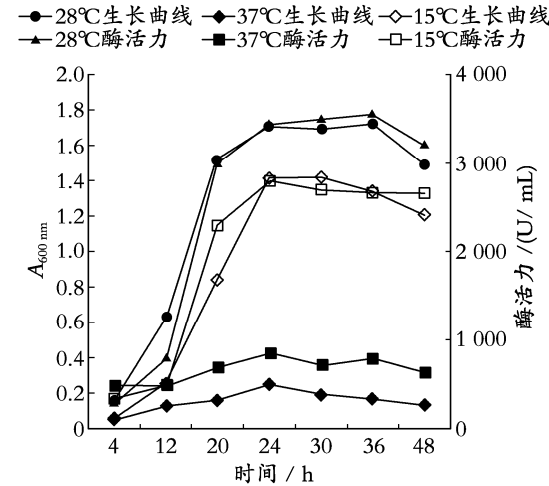


图 1 温度对鳗弧菌 W-1 菌体生长及胞外蛋白酶表达的影响

Fig.1 Effect of different temperatures on the growth and protease expression of *V. anguillarum* W-1

表 1 不同碳源物质对鳗弧菌生长和蛋白酶活力的影响

Tab. 1 Effect of carbohydrates on growth and protease expression of *V. anguillarum* W-1

碳源	W-1 相对菌浓度 (%)	W-1 相对酶活力 (%)
对照	100	100
1%葡萄糖	175	77.87
1%蔗糖	130	79.64
1%麦芽糖	128	98.64

2.3 抗生素对鳗弧菌生长和蛋白酶表达的影响

从表 2 可以看出，添加不同浓度的氨苄青霉素对菌体生长和蛋白酶活力的表达均有抑制作用，而且高浓度氨苄青霉素 (50,100 mg/L)的抑制作用显著 ($P<0.05$)。

表 2 不同质量浓度氨苄青霉素对鳗弧菌 W-1 生长及酶活力的影响

Tab. 2 Effect of Ampicillin on the growth and protease expression of *V. anguillarum* W-1

氨苄青霉素质量 浓度(mg/L)	鳗弧菌 W-1	
	相对菌浓度 (%)	相对酶活力 (%)
0	100	100
10	78.90	82.37
50	45.37	26.65
100	42.07	14.67

2.4 金属螯合剂对鳗弧菌生长及胞外蛋白酶表达的影响

如图2所示, 1 mmol/L EDTA 对于鳗弧菌 W-1 的生长和胞外蛋白酶的表达均有极显著的抑制作用 ($P < 0.01$); 1 mmol/L 的 EGTA 对鳗弧菌 W-1 生长和胞外蛋白酶表达没有显著影响 ($P > 0.05$)。

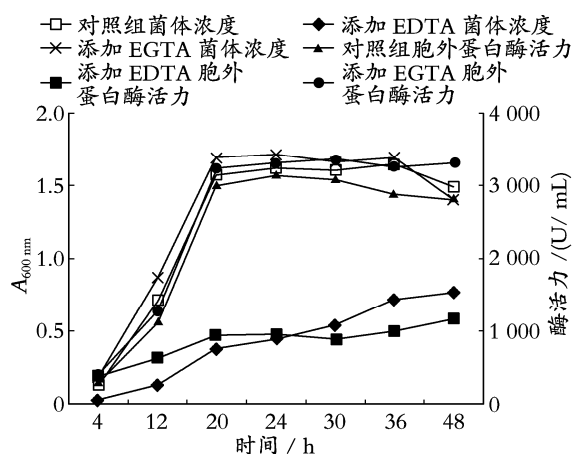


图2 金属螯合剂对鳗弧菌生长及蛋白酶表达的影响

Fig.2 Effects of EDTA and EGTA on the growth and extracellular protease activity of *V. anguillarum* W-1

3 讨论

环境温度对病原菌的生长有较大影响, 鳗弧菌 W-1 在 2216E 海水培养基中, 15, 28, 37 °C 条件下培养均能生长, 其中在 28 °C 时的生长和胞外蛋白酶活力最高, 表明 28 °C 为鳗弧菌的最适合生长温度; 在 15 °C 条件下, 鳗弧菌生长和胞外蛋白酶的表达有一定的降低, 但差异不显著, 在较高温度 (37 °C) 下, 菌体生长和胞外蛋白酶的表达均受到显著的抑制, 这与鳗弧菌生长自然环境相一致, 鳗弧菌在中国北方海水养殖动物和海水环境中较为普遍, 而北方地区沿海的水温度变化范围在 12~30 °C 左右。进一步分析鳗弧菌 W-1 在 28 °C 时的生长曲线和胞外蛋白酶的分泌, 发现从 6~21 h 处于对数生长期, 在 24 h 时候菌浓度均达到最大; 胞外蛋白酶的分泌随着菌体的生长逐渐升高, 并在 24 h 达最大分泌量, 约 36 h 后缓慢下降, 其蛋白酶的分泌跟菌体的生长基本同步; 而 Croxatto 等^[11]的研究表明, 鳗弧菌蛋白酶的分泌受密度调控基因的控制, 只有当菌体浓度达到一定范围时, 鳗弧菌才开始分泌蛋白酶。

葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等碳源物质均能显著促进鳗弧菌的生长, 其中以葡萄糖作用最明显, 蔗糖

和麦芽糖次之, 而胞外蛋白酶活力则明显下降, 说明蛋白酶产生受代谢阻遏系统的调节。糖类对蛋白酶产生抑制, 可能是菌体在具有充足的能量物质时减少蛋白酶的分泌, 而当缺乏糖类等碳源时, 细菌可分泌胞外蛋白酶以水解环境中的蛋白类物质, 获得小肽、氨基酸等作为氮源、碳源等能量物质, 满足其生长的需要。Long 等^[12]在溶藻弧菌中也发现类似的现象。

EDTA 可以螯合革兰氏阴性菌细胞外膜中磷酸盐残基和脂多糖分子中的 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} , 并可以螯合细胞膜上通道蛋白中的 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} , 从而直接影响细胞外膜结构和功能的完整性^[13]。Michelle 等^[14]研究发现, 不同浓度 EDTA 对于 O2 血清型鳗弧菌的生长有抑制作用和细胞毒性作用, 0.6~5 mmol/L 的 EDTA 明显抑制 O2 血清型鳗弧菌大部分蛋白质的表达。在本研究中添加 1 mmol/L 金属离子螯合剂 EDTA 后, 鳗弧菌 W-1 菌体生长及胞外蛋白酶的分泌均受到显著的抑制, 这与 Michelle 等^[14]的研究结果相一致。EGTA 是一种钙离子螯合剂, 但 EGTA 的加入对于鳗弧菌 W-1 的生长和胞外蛋白酶表达没有显著影响, 其机制有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Egidius E. Vibriosis: pathogenicity and pathology, a review[J]. *Aquaculture*, 1987, 67:15-18.
- [2] Myhr E, Larsen J L, Lillehaug A, et al. Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway[J]. *Appl Environ Microbial*, 1991, 57 (9):2 750-2 757.
- [3] Crosa J H. A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system [J]. *Nature*, 1980, 283:556-566.
- [4] Singer J T, Schmidt K A, Reno P W. Polypeptides p40, pOM2, and pAngR are required for iron uptake and for virulence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775 [J]. *J Bacteriol*, 1991, 173:1 347-1 352.
- [5] Lida T, Honda T. Hemolysins produced by *Vibriosis*[J]. *Journal of Toxicology*, 1997, 16: 215-227.
- [6] Inamura H, Nakai T, Muroga K. An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*[J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1985, 51 (2):1 915-1 920.
- [7] Milton D, Norqvist A, Wolf-Watz H. Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*[J]. *J Bacteriol*, 1992, 174 (22):7 235-

- 7 244.
- [8] 陈吉祥, 刘 霜, 李 筠, 等. 1种致病性鳃弧菌胞外蛋白酶的分离纯化及性质[J]. 中国水产科学, 2002, 9:318-322.
- [9] 陈吉祥, 李 筠, 王祥红, 等. 致病性鳃弧菌金属蛋白酶基因克隆及序列分析[J]. 高技术通讯, 2002, 12 (6): 106-110.
- [10] 肖 慧, 李 军, 徐怀恕, 等. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病原的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1999. 29(1): 89-93.
- [11] Croxatto A, Chalker V J, Lauritz J, *et al*, A homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184 (6): 1 617-1 629.
- [12] Long S, Mothibeli M A, Robb F T, *et al*. Regulation of extracellular alkaline activity by histidine in a collagenolytic *Vibrio alginolyticus* strain [J]. *J Gen Microbiol*, 1981, 127: 193-199.
- [13] Benz R K, Janko W B, Lauger P. Formation of large ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 511: 305-319.
- [14] Michelle L, Hancock R W, Mutharia L M. Influence of culture conditions on expression of the 40-kilodalton porin of *Vibrio anguillarum* serotype O2[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (1): 138-146.

Effect of culture conditions on the growth and extracellular protease expression of *Vibrio anguillarum* W1

CHEN Ji-xiang, LIU Bin, CHI Zheng-hao, LI Yun, ZHANG Xiao-hua

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Dec., 18, 2006

Keywords: culture conditions; *Vibrio anguillarum*; extracellular protease; expression

Abstract: *Vibrio anguillarum* is a pathogen of aquacutic animals. The extracellular protease has been considered as a putative virulence factor involved in pathogenic mechanism of the bacterium. In this study, the effects of culture conditions on the growth and extracellular protease production of *V. anguillarum* W1 were studied. The optimal temperature for bacterial growth and protease production was at 28°C. When the bacterium was cultured at 37°C, both cell growth and protease secretion were greatly reduced. Addition of glucose, sucrose, and maltose to the medium greatly increased the bacterial growth, but decreased secretion of the extracellular protease. 1mmol/L of EDTA could obviously prevent bacterial growth and protease activity, while addition of EGTA did not have obvious effect on the cell growth. The bacterial growth and secretion of the proteases were also inhibited by different amounts of ampicillin.

(本文编辑:张培新)