

副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析*

牟海津 李 筠 包振民 杨学宋[†] 徐怀恕

(青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

[†](山东莱州大华水产养殖研究所 莱州 261413)

提要 1990 年 6—9 月,从青岛上马镇对虾养殖场患败血症的中国对虾血淋巴内分离到副溶血弧菌 25-C 菌株,利用平板玻璃纸覆盖技术,获得 25-C 菌株的胞外产物 (ECP),进行成分分析和致病性研究。结果表明,副溶血弧菌 25-C 菌株的胞外产物具有多种酶活性和溶血活性,是病原菌感染中国对虾的主要因素,单独注射感染即可导致中国对虾的严重发病至死亡,ECP 蛋白可以破坏中国对虾血清的体外杀菌活力,提高 25-C 菌株对中国对虾的致病能力。聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果表明,ECP 蛋白中含有 23 条蛋白带。对具有溶血活性的蛋白组分进行热稳定性测试后,认为有两种溶血因子。经感染分析,发现其中具有热稳定性溶血活性和蛋白酶活性的两组蛋白对中国对虾具有明显的致病作用,可能是决定细菌毒力的主要因素。

关键词 副溶血弧菌 胞外产物 中国对虾 溶血活性 蛋白酶活性

学科分类号 S945.1

细菌是中国对虾致病的主要因素之一,其致病机理错综复杂,如产生胞内或胞外毒性物质 (Inamura *et al.*, 1984; Kanemori *et al.*, 1987; Kodama *et al.*, 1985; Munn, 1980)、质粒介导的铁吸收系统 (Crosa, 1980)、对血清杀菌活力的抗性 (Trust *et al.*, 1981)、与宿主组织的粘附力 (Horne *et al.*, 1983) 等已有报道,而这些研究大部分仅限于致病菌对鱼类的作用,关于在对虾方面的研究尚未见报道。许兵等 (1993) 认为,副溶血弧菌和溶藻胶弧菌的胞外蛋白酶对中国对虾具有明显的致病作用,张洪 (1994)¹⁾ 进一步证实副溶血弧菌胞外蛋白酶的酶活性和致病性具有热不稳定性。本文以副溶血弧菌为对象,对其胞外产物的致病性进行进一步的探索与分析,以期为中国对虾病原菌致病机理的研究提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 副溶血弧菌胞外产物 (ECP) 的制备与初步纯化

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 25-C 菌株为本实验室 1990 年 6—9 月从青岛沿海对虾养殖场患败血症的中国对虾体内分离到。采用平板玻璃纸覆盖技术 (Inamura *et*

* 国家“八五”科技攻关资助项目,85-15-03-03 号。牟海津,男,出生于 1973 年 3 月,硕士,现工作单位:青岛海洋大学水产学院, E-mail:fst@ouqd.edu.cn

1) 张 洪,1994. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究. 青岛海洋大学硕士学位论文

收稿日期:1997-10-11,收修改稿日期:1998-12-15

al, 1984)于25℃培养24h,获得25-C菌株的胞外产物(ECP),再通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析法(Inamura *et al*,1985)获得ECP的沉淀蛋白,经透析、抽提、浓缩、过滤除菌后得到ECP蛋白制品。于-20℃保存。

1.2 胞外产物中的蛋白含量与活性分析

用紫外吸收法测定ECP中的蛋白质含量。以杯碟法测定ECP的酶活性及溶血活性(许兵等,1993)。分别用蒸馏水配制含明胶(0.4%)、酪蛋白(0.4%)、几丁质(1.0%)、淀粉(0.2%)、蛋黄(2.5%)、吐温80(1.0%)、尿素(2.0%)及酚红指示剂等的琼脂平板以及脱纤维羊血平板,将无菌小杯放于平板上,加入ECP或ECP蛋白溶液,35℃保温48h。检查ECP蛋白中各种酶活性以及溶血活性。

1.3 胞外产物的致病作用

1.3.1 25-C菌悬液、菌体细胞、ECP及ECP蛋白对中国对虾的致病性比较

实验用虾(体长为7.2—8.0cm)于水槽中暂养24h。分别用25-C菌悬液、ECP、菌液离心洗涤后所得的沉淀细胞进行肌肉注射感染对虾,对照组注射无菌0.01mol/L PBS(pH=7.0)。

及时将水槽中的濒死对虾取出,进行心脏穿刺(以24h内发病对虾为宜),抽取血淋巴,稀释后涂布于2216E平板上,检测病虾血淋巴中的细菌数量。

1.3.2 ECP蛋白对中国对虾体质的影响

1.3.2.1 ECP蛋白对中国对虾血清体外杀菌力的影响 取健康中国对虾,心脏穿刺抽取血淋巴,4℃过夜后,低速离心获得血清。取0.5ml对虾血清于试管中,分别加入0 μ l、1 μ l、5 μ l、50 μ l、500 μ l ECP蛋白制品,然后补充生理盐水至1ml,混匀后25℃保温2h。将保温后的血清分别与等量的副溶血弧菌25-C菌悬液混合,25℃处理2h,并不停振荡。经适当稀释后,取0.1ml涂布2216E平板,检测细菌数量。对照组采用经50℃ 30min处理的失活血清与细菌反应。

1.3.2.2 ECP蛋白预感染对虾后,25-C菌株致病能力的变化 先用亚致死剂量的ECP蛋白对中国对虾进行预处理,即每尾对虾肌肉注射0.02ml ECP蛋白制品(含量约10 μ g),间隔一段时间后,再用25-C菌悬液(直接计数浓度为 5×10^5 细胞/ml)进行肌肉注射感染,注射量0.02ml/尾,对照组用0.02ml灭菌的0.01mol/L pH=7.0的PBS做预处理实验。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步分离纯化ECP蛋白质

采用7.5%的聚丙烯酰胺凝胶,垂直平板电泳分析ECP蛋白质。取3mm厚度的梳子用透明胶带封住中央试样格,仅在梳子两端留出两格,中央试样格加样量为4—5ml,4℃100V电压下电泳20h后,将凝胶取出,切下两端未封口试样格的凝胶,用考马斯亮兰G250溶液染色,按所染出的蛋白条带对应中央凝胶,分组切取相应的凝胶带,放入少量0.01mol/L PBS中,搅碎后浸泡过夜,离心去除凝胶,经0.2 μ m滤膜过滤除菌后,获得纯化程度较高的蛋白组分。

1.5 电泳获得的各蛋白质组分的蛋白质含量、酶活性、溶血活性的测定及致病性分析

紫外吸收法分别测定各组ECP蛋白质的蛋白含量,并按上述方法测定蛋白质的各种酶活性和溶血活性。

各组蛋白质溶液经适当浓缩后(浓度约为 0.5mg/ml), 注射感染中国对虾, 检测致病效果。注射量为 0.04ml/尾。

1.6 ECP 蛋白及纯化组分溶血活性的热稳定性

将 ECP 蛋白质以及电泳分离的具有溶血活性的 E-2、E-8 两组蛋白质溶液用含有 0.85%NaCl 的 0.01mol/L PBS (pH = 7.0) 进行梯度稀释后, 在不同温度下水浴处理 10min, 检测其溶血活性的变化。溶血试验使用 Alsever's 液采集新鲜鸡血, 离心获得沉淀血细胞, 用生理盐水洗涤 2—3 次, 再悬浮于生理盐水中。37℃ 保温 10min 后加入等体积的待测组分混匀, 37℃ 处理 40min, 离心后检查离心管上清液是否变红, 以确定是否有溶血现象发生。

2 结果与分析

2.1 副溶血弧菌 25-C 菌株胞外产物的活性分析

25-C 菌株培养物经离心过滤后获得 500ml 上清液, 即 ECP, 进一步盐析、浓缩后, 得到 30ml ECP 蛋白制品。对 ECP 进行蛋白质含量测定和活性测定发现, ECP 中具有明胶蛋白酶、酪蛋白酶、淀粉酶、卵磷脂酶、脂肪酶、几丁质酶等多种酶活性及溶血活性, 但不具有脲酶活性, 见表 1。

表1 25-C胞外产物活性分析

Tab.1 Acivities of extracellular products of *V. parahaemolyticus* 25-C

分析对象	体积 (ml)	蛋白含量 (mg/ml)	明胶酶	淀粉酶	酪蛋白酶	脂肪酶	卵磷脂酶	几丁质酶	脲酶	溶血活性
ECP	500	0.6	+	+	+	+	+	+	-	+
ECP蛋白	30	4	++	++	++	+	+	+	-	+

注: ++表示酶活性强烈; +表示样品具有酶活性; -表示无酶活

2.2 胞外产物的致病性检测结果

分别用 25-C 菌悬液、洗涤后的菌体细胞以及胞外产物来感染中国对虾后发现, 25-C 的胞外产物具有明显的致病效果, 24h 内对虾死亡率达到 87.5% (表 2), 而且病虾表现出与 25-C 菌悬液所感染病虾基本一致的症状, 即附肢、尾扇变红, 血淋巴凝固能力差等。但不同的是, 血淋巴液不混浊, 镜检发现没有或只有少量细菌, 而且致病效力发挥较快, 12h 内对虾死亡率即达到 62.5%。

表2 25-C菌株及其胞外产物对中国对虾致病性的比较

Tab.2 The pathogenicity comparison between *V. parahaemolyticus* 25-C and its ECP to *P. chinensis*

感染成分	注射量	实验虾数 (尾)	死亡虾数(尾)				48h死亡率
			6h	12h	24h	48h	
菌悬液	2×10 ⁶ cell/尾	8	1	2	3	2	100%
ECP	0.04ml/尾	8	1	4	2		87.5%
ECP蛋白	10μg/尾	5					0
	20μg/尾	5	2				40%
	50μg/尾	5	2	2	1		100%
洗涤后的菌体细胞	2×10 ⁶ cell/尾	8	1	1			25%
对照 (0.01mol/L PBS)	0.04ml/尾	5					0

25-C 菌体细胞经反复洗涤后,对血淋巴杀菌活性的抵抗力降低,很容易被虾体内的免疫系统排除,难以生长繁殖。进入虾体后,细胞数量迅速减少,24h 内即减到 7.0×10^2 CFU / ml 血淋巴(表 3),而未洗涤的菌体侵入虾体后,24h 内数量达到 3.4×10^8 CFU / ml 血淋巴。另外,这些洗去胞外产物的细胞的致病能力也大大降低,仅依靠对虾体吞噬细胞造成一定的破坏作用和菌体细胞内可能存在的致病成分使对虾发病。因此,洗涤后菌体细胞的致死率远远不如等量的培养菌体细胞。

表3 发病中国对虾血淋巴液中的细菌数(菌落形成单位/ml)

Tab.3 Number of bacteria in hemolymph of diseased *P. chinensis* (CFU/ml)

感染成分	感染12h后计数	感染24h后计数
菌悬液	1.2×10^7	3.4×10^8
洗涤后的菌体细胞	2.1×10^3	7.0×10^2
ECP	—	2.0×10^2
对照(0.01mol/L pH=7.0 PBS)	—	—

2.3 ECP 蛋白对中国对虾体质的影响结果

2.3.1 ECP 蛋白对中国对虾血清体外杀菌力的影响结果 对虾血清中含有的各种免疫因子具有明显的抗菌溶菌活性,能有效地抑制和杀死侵入机体内的细菌,而经 ECP 蛋白处理过的血清的杀菌活性大大降低。当 ECP 蛋白的作用剂量达到 $50 \mu\text{l}$ 时,对虾血清对细菌的作用效果已相当微弱。ECP 蛋白对对虾血淋巴的作用主要归因于其中的蛋白酶成分对血清中各种免疫因子的破坏作用(表 4)。

表4 ECP 蛋白对中国对虾血清体外杀菌力的影响

Tab.4 Effects of ECP protein on the bactericidal activity of serum of *P. chinensis* in vitro

虾血清(ml)	ECP 蛋白(μl)	血清处理后的菌数(CFU/ml)
0.5	0	1.2×10^3
0.5	1	1.3×10^3
0.5	5	6.3×10^3
0.5	50	1.8×10^5
0.5	500	2.2×10^5
热失活血清(50°C, 30min)	0	2.2×10^5

2.3.2 ECP 蛋白预注射中国对虾后,25-C 菌株致病能力的变化情况 中国对虾经亚致死剂量的 ECP 蛋白预注射,间隔 2h 或 2d 后,再用 25-C 菌株感染,两天内的致死情况见表 5。实验结果表明,经 ECP 蛋白注射的中国对虾体质明显下降,少剂量的致病菌感染便会引起对虾的严重发病,因此,细菌胞外产物在细菌侵入和感染机体的过程中起到了关键性的作用。但是,不足量的胞外产物在虾体中也很快地被破坏分解掉,并逐渐失去其致病作用。预注射后间隔 2d 再进行的 25-C 感染实验,对虾致死率降低至 60%。

由以上实验结果可见,副溶血弧菌在感染中国对虾的过程中,胞外产物起到了极为重要的作用,单独注射中国对虾即可引起对虾发病甚至死亡;而且,它对于破坏对虾免疫功能、促进副溶血弧菌在虾体内生长繁殖、增强副溶血弧菌的致病力等也是必不可少的。

表5 中国对虾经ECP蛋白预处理后,25-C再感染的致死情况

Tab.5 Predisposing effects of ECP protein on the mortality of *P. chinensis* challenged with *V. parahaemolyticus* 25-C

预处理	25-C再感染剂量 (cell/尾)	实验虾数 (尾)	感染48h致死率	
			A	B
ECP蛋白(10 μ g)	1.0 \times 10 ⁴	5	100%	60%
PBS	1.0 \times 10 ⁴	5	20%	20%

A. 预处理后间隔2h再进行25-C感染的致死情况; B. 预处理后间隔2d再进行25-C感染的致死情况

2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离ECP蛋白

ECP蛋白的PAGE图谱中共显示出23条蛋白带,以相距较近的蛋白带作为一组进行切割(图1),共获得10组蛋白质。

由表6可见,具有明胶酶活性和酪蛋白酶活性的第6组蛋白电泳条带(E-6)和具有溶血活性的第8组条带(E-8)能够产生明显的致病效果。因此,25-C胞外产物的致病作用可能同它的蛋白酶活性和溶血活性密切相关,蛋白酶和溶血素可以直接造成中国对虾的严重致病,成为25-C菌株致病作用的主要成分之一。而其它各种酶类,如卵磷脂酶、脂肪酶、几丁质酶(未在分离蛋白中检出,可能在分离过程中失活)等,在感染中国对虾的过程中也可能起到了重要的辅助作用,有利于25-C菌株侵入虾体并在虾体内蔓延扩散以及毒性物质的作用发挥。

2.5 ECP蛋白及纯化组分溶血活性的热稳定性检测

ECP蛋白浓缩液(蛋白质含量4mg/ml)用含有0.85%NaCl的0.01mol/L PBS(pH=7.0)进行梯度稀释,不同温度下水浴处理后,发现溶血作用的热稳定性较高,

100 $^{\circ}$ C处理10min后,仍具有很强的溶血活性。然而,ECP蛋白经60—70 $^{\circ}$ C处理10min后,溶血活性则受到较大程度的破坏,在1:4的稀释度下,只表现出微弱的溶血现象(表7)。Zen-Yoji等(1976)及Yanagase等(1970)在对副溶血弧菌溶血活性的研究中,也观察到类似的现象,Miwatani等(1976)把这一现象称作Arrhenius效应。

有关副溶血弧菌热稳定性溶血素(Sakurai *et al*,1973)和热不稳定性溶血素(Fujino

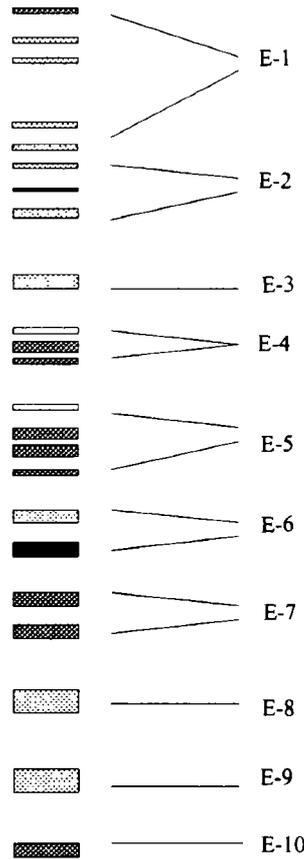


图1 ECP蛋白的PAGE图谱

Fig.1 PAGE of ECP protein

注:按组切割蛋白凝胶带,共获得E-1—E-10十组蛋白质

表6 PAGE分离蛋白的活性和致病性

Tab.6 Activities and pathogenicity of the proteins separated by PAGE

电泳条带	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	E-6	E-7	E-8	E-9	E-10	ECP蛋白
蛋白含量(mg/ml)	0.25	0.28	0.40	0.49	0.56	0.53	0.52	0.24	0.31	0.42	4.00
明胶酶						++	+				++
酪蛋白酶						+					++
淀粉酶				+	+						++
脂肪酶				++	+						++
卵磷脂酶							+				++
几丁质酶											+
脲酶											
溶血		+						+			+
2d内对虾致死性 (死亡数/总数)	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5	4/5	1/5	5/5	0/5	0/5	2/5

注: ++表示酶活性强烈, +表示样品具有该酶活性

表7 ECP蛋白溶血活性的热稳定性

Tab.7 Heat stability of hemolytic activity of ECP protein

ECP蛋白(蛋白含量4mg/ml)	1:1	1:4	1:16	1:64
未处理的	+	+	+	+
50℃	+	+	+	±
60℃	+	±	-	-
70℃	+	±	-	-
80℃	+	±	±	-
90℃	+	+	±	±
100℃	+	+	±	±

注: +表示溶血现象明显; ±表示溶血活性微弱; -表示无溶血现象发生。表8同

表8 E-2、E-8蛋白组分溶血活性的热稳定性

Tab.8 Heat stability of hemolytic activities of E-2 and E-8

蛋白组分	处理情况	1:1	1:4	1:16	1:64
E-2(蛋白含量0.2mg/ml)	未处理	+	+	-	-
	70℃	-	-	-	-
	100℃	-	-	-	-
E-8(蛋白含量0.2mg/ml)	未处理	+	+	±	±
	70℃	+	±	±	-
	100℃	+	+	±	-

et al, 1969; Miwatani *et al*, 1972) 方面的报道已经很多。在本次实验中, 电泳获得的两组具有一定溶血活性的蛋白组分 E-2和 E-8经梯度稀释后, 进行热稳定性实验, 发现 E-2的溶血活性具有热不稳定性, 70℃处理 10min 则溶血活性完全丧失, 而 E-8的溶血活性相对比较稳定, 100℃处理 10min 后, 仍具有很强的溶血性(表 8)。从以上实验中可以看出, 对中国对虾具有明显致病作用的是热稳定性溶血素。

3 结语

3.1 副溶血弧菌的胞外产物具有多种酶活性, 是细菌侵染中国对虾的主要成分之一, 其作用有: 破坏对虾的体质, 分解破坏对虾的组织成分, 有利于其它病原的进一步侵染; 破坏对虾血淋巴中凝血系统的酶活性; 破坏对虾血细胞, 导致溶血现象的发生; 破坏对虾血清的杀菌活性等。

3.2 副溶血弧菌胞外产物中的蛋白酶和耐热性溶血素是影响细菌毒力的重要因素, 对中国对虾具有明显的致病作用; 而其它各种酶类, 如卵磷脂酶、脂肪酶、几丁质酶等在感染对虾的过程中也可能起到了重要的辅助作用, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- 许 兵, 纪伟尚, 徐怀恕等, 1993. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究. 海洋学报, 15(1): 98—106
- Crosa J H, 1980. A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. Nature, 284: 566—568
- Fujino T, Miwatani T, Takeda Y *et al*, 1969. A thermolabile direct hemolysin of *V. parahaemolyticus*. Biken J, 12: 145—148
- Home M T, Baxendale A, 1983. The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. J Fish Dis, 6: 461—471
- Inamura H, Muroga K, Nakai T, 1984. Toxicity of extracellular products of *V. anguillarum*. Fish Pathol, 19(2): 89—96
- Inamura H, Nakai T, Muroga K, 1985. An extracellular protease produced by *V. anguillarum*, Bull Jpn Soc Sci Fish, 51(12): 1915—1920
- Kodama H, Moustafa M, Mikami T *et al*, 1985. Characterization of extracellular substance of *V. anguillarum*, toxic for rainbow trout and mice. Microbiol Immunol, 29(10): 909—920
- Kanemori Y, Nakai T, Muroga K, 1987. The role of extracellular protease produced by *V. anguillarum*. Fish Pathol, 22(3): 153—158
- Miwatani T, Sakurai J, Yoshihara A *et al*, 1972. Isolation and partial purification of thermolabile direct hemolysin of *V. parahaemolyticus*. Biken, J, 15: 61—66
- Miwatani T, Takeda Y, 1976. *Vibrio parahaemolyticus*: A Causative Bacterium of Food Poisoning. Tokyo: Saikon Publishing Co Ltd, 58—99
- Munn C B, 1980. Production and Properties of a Haemolytic Toxin by *Vibrio anguillarum*. In: Ahne W ed. Fish Diseases. Berlin: Springer-Verlag, 69—74
- Sakurai J, Matsuzaki A, Miwatani T, 1973. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *V. parahaemolyticus*. Infect Immun, 8(5): 775—780
- Trust T J, Courtice I D, Khouri A G *et al*, 1981. Serum resistance and hemagglutination ability of marine vibrios pathogenic for fish. Infect Immun, 34: 702—707
- Yanagase Y, Inoue K, Ozaki M *et al*, 1970. Hemolysins and related enzymes of *V. parahaemolyticus*: I. Identification and partial purification of enzymes. Biken J, 13: 77—92
- Zen-Yoji H, Kudoh Y, Igarashi H *et al*, 1976. Further studies on characterization and biological activities of an enterpathogenic toxin of *V. parahaemolyticus*. Animal Plant Microbial Toxins, 1: 479—498

PATHOGENICITY OF EXTRACELLULAR PRODUCTS OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* TO *PENAEUS CHINENSIS*

MOU Hai-jin, LI Yun, BAO Zhen-min, YANG Xue-song[†], XU Huai-shu

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

[†](Shandong Laizhou Da Hua Fisheries Culture Research Institute, Laizhou, 261413)

Abstract *V. parahaemolyticus* 25-C was isolated from the hemolymph of *Penaeus chinensis* with septicaemia from Shangma prawn culturing farm in Qingdao from June to September, 1990. Its extracellular products (ECP) were obtained, using the cellophane plate technique. ECP protein was partially purified by precipitation with ammonium sulfate, dialysis, extraction of water, concentration with PEG 6000, and filter sterilization. The products were stored at -20°C until required. The protein content, enzyme activities and hemolytic activity of ECP were detected. The toxicity of ECP to *P. chinensis* and the effect on the bactericidal activity of serum of *P. chinensis* in vitro were studied. Then the predisposing effect of ECP on the mortality of *P. chinensis* challenged with *V. parahaemolyticus* was studied too. By polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), ECP protein was separated and purified further. Biochemical activities and pathogenicity of the purification fractions were detected, and heat stability of the fractions with hemolytic activity was studied.

The results indicate that ECP of *V. parahaemolyticus* 25-C possessed hemolytic activity and various enzyme activities, such as gelatinase, casease, amylase, lipase, lecithinase and chitinase. It could be considered as one of the main substances of pathogen infecting *P. chinensis*. By intramuscular injection alone, ECP caused prawn's diseases and resulted in high mortality. ECP protein of 25-C could destroy the bactericidal activity of prawn's serum. Pre-infected with ECP protein, the pathogenicity of strain 25-C increased greatly. Therefore ECP protein could destroy prawn's physique and promoted the proliferation of bacteria in prawns.

ECP protein gave 23 bands by PAGE. The protein content with hemolytic activity was assayed on its thermal stability and two hemolytic factors were detected. One was thermolabile, destroyed by heating at 70°C for 10 min; the other was thermostable, not inactivated by heating at 70°C or 100°C for 10 min. Infection analysis shows that proteins with thermostable hemolytic activity or proteolytic activity had obvious pathogenic activity to *P. chinensis*. This may be one of the main factors determining the virulence of *V. parahaemolyticus*. Other enzymes such as lecithinase, chitinase and lipase, also played some supplementary roles in the process of *P. chinensis* infection.

Key words *Vibrio parahaemolyticus* Extracellular products *Penaeus chinensis* Hemolytic activity Proteolytic activity

Subject classification number S945.1