

嗜水气单胞菌 S 蛋白的提纯及特性分析*

严亚贤¹ 陈怀青 陆承平²

(南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘要 电镜观察表明, 嗜水气单胞菌 J-1 株具有 S 层结构, 在菌体外层呈晶格样规则排列。菌体经酸性甘氨酸缓冲液处理, S 层从菌体上脱落, 离心上清液即为粗提 S 蛋白。进一步经 Sephadex G200 凝胶层析和 DEAE-纤维素离子交换层析纯化, 获得的 S 蛋白呈单一多肽, 分子量为 51500。氨基酸组分分析结果表明, S 蛋白含有天门冬氨酸等 15 种氨基酸, 其中丙氨酸等疏水性氨基酸占 36.8%。生物学活性显示, S 蛋白对 Vero 细胞有轻微的细胞毒性, 但没有溶血性, 对鲫鱼和小鼠也无致死作用。用自制的嗜水气单胞菌 J-1 株 S 蛋白抗血清 PM 及 PR 和国外提供的嗜水气单胞菌 TF7 株 S 蛋白抗血清 PF1 分别作免疫转印和间接 ELISA, 检测来源于不同地区和不同动物种类的 20 株嗜水气单胞菌的 S 蛋白。结果表明, S 蛋白的抗原性存在着菌株间的差异。另外, 某些菌株不具有 S 层。

关键词 嗜水气单胞菌, S 蛋白, 纯化, 生物学活性, 抗原性

嗜水气单胞菌是一种革兰氏阴性有运动力的短杆菌, 能引起软体动物、鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类等多种动物的败血症及人类的腹泻和食物中毒等^[1~3], 其致病作用日益受到重视。有关其致病机制的研究已成为当前病原细菌学研究的又一新课题^[4]。

外毒素是嗜水气单胞菌的重要致病因子^[5~7]。就致病菌而言, 细菌侵入机体后, 首先要定居和增殖, 然后才能有效地释放毒素。向定居和体内增殖都与细菌的表层结构有关。许多致病菌在菌体的外表面有一层晶格样排列的特殊表层结构, 即所谓 S 层。构成 S 层的蛋白亚单位称为 S 蛋白。由于 S 层位于菌体的最外层, 完整地包裹着菌体, 其致病作用受到普遍关注^[8]。作者于 1993 年首次报道了国内分离的嗜水气单胞菌 J-1 株具有 S 层^[9], 本试验则对其 S 蛋白进行了纯化及特性分析。

1 材料和方法

1.1 菌株

本试验采用了 20 株嗜水气单胞菌, 其中 W-1 株系从非养鱼塘水样分离, AS1.927 株宿主不详, 其余 18 株来自患病鱼、鳖、龟、禽及兽, 并有地区代表性, 详见表 1。

1.2 S 蛋白的提纯

* 国家自然科学基金资助项目。

1. 现工作单位: 上海农学院动物科学系, 上海 201101.

2. 通讯作者。

本文于 1995 年 2 月 4 日收到。

表1 嗜水气单胞菌菌株

Table 1 *Aeromonas hydrophila* strains

菌株 Strains	宿主 Host	来源 Sources
J-1	鲤 Crucian carp	自行分离 authors
B-1	鳊 blunt-snout bream	自行分离 authors
S-1	鱥 rice eel	自行分离 authors
W-1	塘水 pond water	自行分离 authors
Y-1	鳙 bighead carp	自行分离 authors
B	中华鳖 turtle	自行分离 authors
TPS-30	鳊 blunt-snout bream	浙江淡水水产研究所 Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, China
TPS-49	鲢 silver carp	浙江淡水水产研究所 Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, China
AS1.927		中科院微生物研究所 Institute of Microbiology, Academica Sinica
AY-91101	鲢 silver carp	中科院水生生物研究所 Institute of Hydrobiology, Academica sinica
BCH	channel catfish	珠江水产研究所 Zhujiang Fisheries Institute China
LL 1 / 88	鲤 mirror carp	德国汉诺威兽医学院 Hannover Veterinary School, Germany
F155	观赏鲈 Thomas-perch	德国吉森大学 Giessen University, Germany
Fnn	鱼 fish	德国吉森大学 Giessen University, Germany
P5789	龟 tortoise	德国吉森大学 Giessen University, Germany
1292	海豚 dolphin	德国吉森大学 Giessen University, Germany
4288	鹿 deer	德国吉森大学 Giessen University, Germany
S169	马 horse	德国吉森大学 Giessen University, Germany
N8a	鸡 chicken	德国联邦卫生局 Federal Health Administration, Germany
N9a	鸡 chicken	德国联邦卫生局 Federal Health Administration, Germany

参照 Dooley 等的方法^[10]进行。将营养琼脂上培养过夜的 J-1 株菌体用 0.2mol/L 甘氨酸缓冲液 (pH4.0) 处理, 4℃ 搅拌 30min, 离心 (12000g) 20min。所获上清液用 6mol/L NaOH 中和后, 再用 0.45μm 孔径的滤膜抽滤, 经浓缩后即获粗提 S 蛋白。粗提的 S 蛋白用 Sephadex G200 凝胶层析和 DEAE-纤维素离子交换层析进一步纯化。

1.3 电镜观察

将粗提的 J-1 菌株 S 蛋白直接滴在铜网上, 2% 铬酸负染; 培养过夜的菌体作超薄切片, 醋酸铀染色。所有样品均用 Hitachi JEM-100XC 透射电镜观察。

1.4 S 蛋白抗血清的制备

参照 Kostrzynska 等的方法^[11]进行。将提纯的 J-1 菌株 S 蛋白直接免疫家兔, 制得抗血清 PR; 将同样的纯化 S 蛋白先用 SDS 变性, 然后再免疫小鼠, 制得抗血清 PM。而抗血清 PF1 则为兔抗嗜水气单胞菌 TF7 株 S 蛋白血清, 由加拿大维克多利亚大学 Trust 教授惠赠。

1.5 特性分析

参照涂小林等的方法^[6]进行生物学活性分析, 即用 1% 人 O 型红细胞检测溶血性; 用 Vero 细胞检测细胞毒性; 用小鼠和鲫鱼测定动物致死性。而 S 蛋白与 HEC 毒素之间的抗原性交叉则用点酶法和溶血抑制试验^[12]进行分析。

1.6 氨基酸组分分析

取纯化的 J-1 菌株 S 蛋白 1ml, 用 6mol/L HCl 100℃ 水解 18h, 真空干燥除去 HCl 后, 加 1ml 双蒸馏水溶解。取 50μl 置 Hitachi 835-50 型氨基酸组分自动分析仪进行分析。

1.7 SDS-PAGE 和免疫转印

SDS-PAGE 采用 Laemmli 系统^[13], 电泳后用考马斯亮蓝 R250 染色。免疫转印采用半干转印法^[14], 转印后的硝酸纤维素 (NC) 膜用特异性酶免疫复合物检测, 一抗为 PM、PR 或 PF1, 二抗为相应的酶标抗体, 用二氨基联苯胺 (DAB) 显色。

1.8 ELISA

将不同菌株的甘氨酸缓冲液抽提物倍比稀释后包被酶标板, 经 1% 牛血清白蛋白封闭后, 用 PM、PR 或 PF1 作一抗, 相应的酶标抗体为二抗进行检测, 用邻苯二胺 (OPD) 显色, H₂SO₄ 终止后, 测定 OD₄₉₀。同时设 J-1 菌株纯化的 S 蛋白为阳性对照, 牛血清白蛋白为阴性对照。

2 结果

2.1 电镜观察

嗜水气单胞菌 J-1 株的菌体经甘氨酸缓冲液 (pH4.0) 处理后, S 层成片脱落, 电镜下可见其蛋白亚单位呈规则排列的晶格样结构 (图版 I-1)。当甘氨酸缓冲液的酸碱度低于 pH4.0 时, S 蛋白则不呈晶格样规则排列, 而是以散在的形式存在。细菌菌体超薄切片则可见在菌体外面有一层覆盖于菌体周身的结构, 这就是位于菌体最外层的 S 层 (图版 I-2)。

2.2 SDS-PAGE

嗜水气单胞菌不同菌株的甘氨酸缓冲液抽提物经 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色, 可见 J-1、Y-1、S169 等 6 株嗜水气单胞菌均有一条分子量为 51500 的主要蛋白条带(图版 I-3, 箭头所示)。将 J-1 株粗提 S 蛋白经 Sephadex G200 凝胶层析及 DEAE-纤维素离子交换层析进一步纯化, 收集主峰作 SDS-PAGE, 则为单一蛋白条带, 分子量为 51500, 即为提纯的 S 蛋白。

2.3 氨基酸组分分析

纯化的嗜水气单胞菌 J-1 株 S 蛋白含有天门冬氨酸、苏氨酸及丝氨酸等 15 种氨基酸。其中亮氨酸、苯丙氨酸等疏水性氨基酸占氨基酸总量为 36.8%。而且酸性氨基酸的比例(19.3%)高于碱性氨基酸(14.3%), 但中性氨基酸占大部分(表 2)。

表 2 嗜水气单胞菌 S 蛋白的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of *Aeromonas hydrophila* J-1 and TF7 strains

氨基酸 Amino acid	百分摩尔数 mol% in		氨基酸 Amino acid	百分摩尔数 mol% in	
	J-1	TF7 ^[1]		J-1	TF7 ^[1]
天门冬氨酸 Asp	13.3	15.4	酪氨酸 Tyr	2.0	3.2
苏氨酸 Thr	7.5	7.1	苯丙氨酸 Phe [*]	6.2	4.4
丝氨酸 Ser	6.1	6.8	赖氨酸 Lys	7.5	8.5
谷氨酸 Glu	6.0	8.9	组氨酸 His	3.8	0.6
甘氨酸 Gly	12.2	8.3	精氨酸 Arg	3.0	2.1
丙氨酸 Ala [*]	12.4	12.7	脯氨酸 Pro [*]	—	2.4
缬氨酸 Val [*]	7.2	7.5	色氨酸 Try [*]	—	0.7
甲硫氨酸 Met [*]	—	1.5	半胱氨酸 Cys	1.2	0.0
异亮氨酸 Ile [*]	4.3	2.8	分子量 MW	51.5K	52.5K
亮氨酸 Leu [*]	6.6	8.8	疏水性残基 Hydrophobic residues	36.8%	41.0%

* 疏水性氨基酸 Hydrophobic amino acid.

2.4 特性分析

S 蛋白有轻微的细胞毒性, 可致 Vero 细胞出现细胞病变, 表现为细胞变圆, 但不脱落, 细胞毒价仅 2²。S 蛋白没有溶血作用, 不溶解人 O 型红细胞, 也无动物致死性, 注射 S 蛋白的鲫鱼及小鼠均健活。而 HEC 毒素有很强的细胞毒性及溶血性, 可致 Vero 细胞圆缩、死亡并脱落, 细胞毒价高达 2⁹, 也能溶解人的 O 型红细胞, 溶血价达 2⁷。接种 HEC 毒素的鲫鱼及小鼠 5h 后即开始死亡, 表现出很强的动物致死性, LD₅₀ 分别为 4.44μg 和 3.58μg。S 蛋白的抗体不能抑制 HEC 毒素的溶血作用, 用 HEC 毒素的抗体进行点酶法检测, S 蛋白也为阴性结果。

2.5 抗原性分析

用自行制备的 J-1 株 S 蛋白抗体 PM 对 10 株嗜水气单胞菌甘氨酸抽提物进行免疫转印分析, 结果有 6 株细菌(Y-1、F155、S169、LL1 / 88、N8a 及 TPS-49)在 S 蛋白的位置出现一条浅褐色的条带, 与 J-1 株一致。表明这 6 株菌有 S 蛋白, 且与 J-1 株 S 蛋白有抗原性交叉。而另外 4 株细菌(W-1、4288、AS1.927 及 AY91101)则不显现任何条带,

表明这 4 株菌不是没有 S 蛋白, 就是 S 蛋白抗原性与 J-1 株不同。而用抗体 PR 作免疫转印检测相同的 10 株细菌, 则仅有 Y-1 和 F155 两株显现相应的 S 蛋白条带, 其余各株均无反应。由此可见, PM 的敏感性比 PR 高, 而且 PM 能完全覆盖 PR。因此, 在进行 ELISA 分析嗜水气单胞菌 S 蛋白抗原性时, 就选用 J-1 株 S 蛋白的抗体 PM。

用 J-1 株 S 蛋白的抗体 PM 和国外提供的 TE7 株 S 蛋白的抗体 PF1 进行 ELISA, 分析 20 株已鉴定的嗜水气单胞菌菌株的 S 蛋白, 结果 PM 抗体呈阳性的有 12 株, PF1 抗体呈阳性的有 11 株。其中 PM 和 PF1 均为阳性的有 6 株, 均为阴性的有 3 株。S169 等 6 株菌 PM 反应呈阳性, 而 PF1 为阴性; 4288 等 5 株菌反之, PF1 为阳性, PM 为阴性。

3 讨论

S 层是细菌的一种特殊的表层结构, 最早在螺菌中发现, 随后发现于酵母菌、甲烷球菌、嗜盐菌、固氮菌、芽孢杆菌及气单胞菌等^[8,16]。国内迄今仅有陈怀青等报道了鱼类致病性嗜水气单胞菌 J-1 株具有 S 层^[9], 作者在本文中详细分析了 J-1 菌株 S 蛋白的理化性质、生物学活性及免疫学活性, 尚属初次探讨。

S 层呈晶格样排列于菌体细胞的最外层, 是细菌与外界环境接触的第一道屏障, 具有多种生物学功能, 如保护性屏障、离子通道等。S 层在病原菌致病过程中的作用尤其引人注目, 对鱼致病的杀鲑气单胞菌的 S 层是其最重要的毒力因子, 没有 S 层的杀鲑气单胞菌毒力下降 10^5 倍。杀鲑气单胞菌 S 层具有多种功能, 如结合胞外基质、免疫球蛋白等, 并能抵抗蛋白酶和补体, 与杀鲑气单胞菌的粘附和体内生存等密切相关^[16]。至于嗜水气单胞菌 S 层的功能, 目前尚不明了。Atkinson 等(1987)认为嗜水气单胞菌的 S 蛋白与粘附有关, 是一种粘附因子^[17]。作者新近的研究结果证实 S 层介导嗜水气单胞菌粘附 HEp-2 细胞(待发表)。此外, 作者用纯化的嗜水气单胞菌 J-1 株 S 蛋白作为免疫原免疫小鼠, 用同源菌攻击, 显示 100% 的保护(待发表)。另一方面, 从水中分离的嗜水气单胞菌 W-1 株没有 S 层, 对小鼠也无致病性^[18]。由此可见, 嗜水气单胞菌的 S 层在其致病和免疫保护中都起着不可忽视的作用。

氨基酸组分分析结果表明, 国内分离的嗜水气单胞菌 J-1 株 S 蛋白的氨基酸组分与国外报道的嗜水气单胞菌 TF7 株极为相似。两者均含有较高比例的疏水性氨基酸, 这对 S 蛋白高级结构的形成及维持其稳定性等均具有重要意义。然而, 测定菌体表面疏水性的盐聚集试验发现, 具有 S 层的 J-1 菌株并不显示强的盐聚集特性, 这表明嗜水气单胞菌 S 蛋白只有在离体条件下才显示强的疏水性, 而在菌体表面组装成完整的 S 层后, 其疏水性则不明显。也就是说, S 蛋白的疏水区域位于其侧区, S 蛋白组装成 S 层后, 其疏水性侧区紧密相连, 并且位于 S 层的内部, 故不表现出疏水性; 而当 S 蛋白离体后, 其疏水性侧区暴露, 从而呈现疏水性。

用 J-1 菌株 S 蛋白的两种抗体 PM 和 PR 作免疫转印, 显示不同的反应性。其结果可把 S 蛋白的抗原位点分布分为两种, 一种是菌株特异性的抗原决定簇, 位于 S 蛋白的表面, 与两种抗体都能反应; 另一种是共同抗原决定簇, 位于 S 蛋白的内部, 需 SDS 变性以后才能暴露。用经过 SDS 变性处理的 S 蛋白作免疫原制备的 PM 抗体, 既能针对表

面的特异性抗原决定簇,又能针对内部的共同抗原决定簇;而用来作变性处理的S蛋白所制PR抗体则仅针对表面抗原位点。用PM和PR作免疫转印,所有待检样品均经SDS变性处理,其内外决定簇均已暴露。因此,PM的免疫转印阳性结果要比PR多。

据报道^[8],细菌S蛋白的抗原性有3种表现形式:①不同菌株的S蛋白其抗原性完全一致,如杀鲑气单胞菌;②同一菌株能同时具备两种抗原性不同的S蛋白,如胎儿弯曲菌;③不同菌株S蛋白的分子量相近,但抗原性有差异。本试验的结果表明,嗜水气单胞菌S蛋白的抗原性正属于第三种模式。如在免疫转印中,Y-1、F155等菌株的S蛋白与J-1株S蛋白的PM和PR两种抗体都反应,而S169、N8a等菌株仅与PM反应,而与PR不反应。同时,用J-1菌株S蛋白的抗血清PM及TF7菌株S蛋白的抗血清PF1的ELISA结果可分为三类。J-1等6株菌的抗原性一致,能与PM和PF1两种抗体反应,是第一类;第二类则仅与PM反应,而不与PF1反应,如S169等;第三类则以4288为代表,它们与PF1反应,但不能与PM反应。由此可见,嗜水气单胞菌S蛋白的抗体较复杂,值得进一步探讨。

J-1菌株S蛋白的分子量为51500,而该菌分泌的HEC毒素的分子量为52500,两者极其相近。S蛋白与HEC毒素是否是同一种物质,极需证实。本试验的结果表明,S蛋白除有轻微的细胞毒性外,没有溶血性,对动物也无致死性,其生物学活性与HEC毒素相差甚远,且抗原性不交叉,故确认两者不是同一种物质。此外,HEC毒素的氨基酸组分(待发表)与S蛋白也不相同,更进一步证实它们是两种不同物质。

参 考 文 献

- [1] 陈怀青,陆承平.南京农业大学学报,1991,14(4):87~91.
- [2] 陆承平.水产学报,1992,16(3):282~288.
- [3] Altweig M, Geiss H K. *CRC Crit Rev Microbiol*, 1989, 16: 253~286.
- [4] 陈怀青,陆承平.淡水渔业,1994,24(特):106~108.
- [5] 陈怀青,陆承平.国外医学——微生物学分册,1992,15(6):256~259.
- [6] 涂小林,陆承平.微生物学报,1992,32(6):432~438.
- [7] Lu Chengping, Chen Huaiqing, Tu Xiaolin. 14th Annual AFS / FHS Meeting, 32th Western Fish Disease Conference, Newport, Oregon, USA, August 1991, 61.
- [8] 陈怀青,陆承平.国外医学——微生物学分册,1993,16(4):157~159.
- [9] 陈怀青,陆承平.南京农业大学学报,1993,16(2):69~73.
- [10] Dooley T G, McCubbin W D, Kay C M et al. *J Bacteriol*, 1988, 170: 2631~2638.
- [11] Kostrzynska M, Dooley J G, Shimojo T et al. *J Bacteriol*, 1992, 174: 40~47.
- [12] 陈怀青,陆承平,陈琼,等.动物检疫,1993,10(4):7~9.
- [13] Laemmli U K. *Nature (London)*, 1970, 227: 680~685.
- [14] Harper D, Liu K M, Kangro H O. *J Virol Methods*, 1990, 30: 25~40.
- [15] Beveridge T J, Graham L L. *Microbiol Rev*, 1991, 55: 684~705.
- [16] Kay W W, Trust T J. *Experientia*, 1991, 47: 412~414.
- [17] Atkinson H M, Trust T J. *Experientia*, 1981, 43: 372~374.
- [18] 严亚贤,孙建和,陈怀青,等.南京农业大学学报,1995,18(4):75~78.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF S-LAYER PROTEIN FROM *AEROMONAS HYDROPHILA*^{*}

Yan Yaxian¹ Chen Huaiqing Lu Chengping²

(School of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract The regular surface protein array (S-layer) present on *Aeromonas hydrophila* J-1 was composed of a single species of protein of apparent molecular weight 51500. This protein was extracted from whole cells by treatment with 0.2mol / L glycine hydrocholoide (pH4.0). The protein was purified by Sephadex G-200 gel filtration chromatography and an ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. Amino acid composition analysis showed that the protein contained 36.8% hydrophobic amino acids. But the protein did not confer hydrophobicity to the cell surface when present as an intact S-layer by salt aggregation test. ELISA and immunoblotting with two different polyclonal antisera against surface exposed-(PM) and non-surface-exposed epitopes (PR) of the protein revealed that the sensitivity of PM was higher than that of PR. Antigenic diversity of the S-layer proteins from 20 bacterial samples was analysed by ELISA with PM and PF1 (polyclonal antiserum aganist *Aeromonas hydrophila* TF7 S-layer protein). The S-layer proteins were distinguishable from the extracellular toxin of the homogeneous strains in antigenic and biochemical characterization and the S-layer proteins were one of the main protective antigens.

Key words *Aeromonas hydrophila*, S-layer protein, Purification, Biological activities, Antigenicity

图版说明

Explanation of plate

- 1.嗜水气单胞菌 J-1 株 S 蛋白的晶格样结构(72000×);2.嗜水气单胞菌 J-1 株菌体超薄切片(箭头所示即 S 层, 36000×);3.嗜水气单胞菌不同菌株甘氨酸抽提物的 SDS-PAGE 图谱。
- 1.The paracrystalline S-layer protein of *Aeromonas hydrophila* J-1 strain; 2.Thin section of *Aeromonas hydrophila* J-1 strain cell (arrow indicate S-layer); 3.SDS-PAGE profile of glycine extract of *Aeromonas hydrophila* strains: A. N8a; B. F155; C. J-1; D. Y-1; E. S169; F. TPS-49; G. Marker.

* This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China.

1. Present address: Department of Animal Science, Shanghai Agricultural College, 210010.

2. Corresponding author.