

养殖石斑鱼溃疡病病原哈维氏弧菌胞外产物的研究

陈雅芳, 王 军, 苏永全, 覃映雪, 王世锋

(厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要:以网箱养殖的患溃疡病青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)分离的哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) TS 628 菌株为研究对象, 采用平板玻璃纸覆盖技术, 获得该菌株的胞外产物(ECP), 并对其成分进行分析。利用杯碟法研究表明, 哈维氏弧菌 TS 628 菌株的胞外产物具有酪蛋白酶、明胶蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、卵磷脂酶等多种酶活性和溶血活性, 且溶血性物质具有热不稳定性。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及考马斯亮蓝 R 250 染色分析表明, ECP 蛋白条带主要集中在分子质量范围 25.0~66.2 ku 之间, 经不同时间培养所获得的 ECP 在凝胶上显示出的蛋白条带几乎一致。采用复性电泳方法(G-PAGE)分析了哈维氏弧菌及其它 4 种弧菌属细菌的 ECP 蛋白酶活性, 结果发现哈维氏弧菌 ECP 在酸性条件下, 蛋白酶活性较强, 在碱性条件下, 蛋白酶带明显减少, 活性很弱。在相同的 pH 条件下, 5 种弧菌中以副溶血弧菌的 ECP 蛋白酶活性最强, 种类多, 分子质量范围宽; 而哈维氏弧菌的蛋白酶带较少, 活性也稍弱。

关键词: 青石斑鱼(*Epinephelus awoara*); 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*); 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*); 胞外产物; 溃疡病

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)10-0030-05

弧菌病是世界各地海水养殖鱼、虾、贝类等动物中普遍流行、危害最大的细菌性疾病之一^[1]。弧菌的致病性取决于其与宿主细胞间的相互作用, 在致病过程中, 弧菌会产生多种胞外产物, 其中与致病有关的毒力因子包括胞外蛋白酶、溶血素、细胞溶素及肠毒素等^[2]。有关弧菌属细菌胞外产物的研究大部分集中于副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)^[3]、河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)^[4]、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)^[5]等, 而关于哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的少见报道。

近年来以哈维氏弧菌为主要致病菌的水产养殖疾病频频爆发^[6~9], 造成了严重的经济损失。作者以哈维氏弧菌 TS 628 菌株为研究对象, 对其胞外产物进行研究, 以期病原弧菌致病性的研究提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

哈维氏弧菌 TS 628 菌株为本实验室 2004 年夏季从厦门同安湾网箱养殖场患溃疡病的青石斑鱼

(*Epinephelus awoara*)和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)分离得到, 副溶血弧菌、河流弧菌、溶藻弧菌、费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)^[10]菌株由本实验室提供。

1.2 哈维氏弧菌胞外产物(ECP)的制备

采用平板玻璃纸覆盖技术^[11]于 25℃ 分别培养 24, 36, 48 h, 获得该菌株不同培养时间的胞外产物(extracellular product, ECP), 暂名为 E₂₄, E₃₆ 和 E₄₈。上清液经透析、抽提, 过滤除菌得 ECP 蛋白, 于 4℃ 保存。ECP 中的蛋白质质量采用考马斯亮蓝 G-250 比色法测定^[12]。

1.3 胞外产物的活性分析

用杯碟法^[13]定量分析了 ECP 中各种酶活性以及溶血活性。分别用陈海水配置含明胶(0.4%), 酪

收稿日期: 2006-01-16; 修回日期: 2006-07-18

基金项目: 福建省科技重大资助项目(2001N009); 国家 863 计划资助项目(2001AA621010)

作者简介: 陈雅芳(1981), 女, 福建厦门人, 硕士研究生; 苏永全, 通讯作者, 电话: 0592-2182501, E-mail: yqsu@jingxian.xmu.edu.cn

蛋白(0.4%),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绵羊血平板,将无菌的滤纸片贴于平板上,加入ECP蛋白制品,35℃保温48h后,分析ECP蛋白中各种酶活性以及溶血活性。

1.4 ECP的溶血价及其热稳定性检测

参照邱德全^[14]方法测定E₂₄、E₃₆和E₄₈对绵羊红细胞(M)和罗非鱼红细胞(L)的溶血价。并将ECP在高温(100℃)下水浴处理10min,检测其溶血价变化情况。

1.5 ECP粗提蛋白的分离

根据萨姆布鲁克SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离^[15],制备聚丙烯酰胺密度为10%的分离胶、5%的积层胶,厚度1mm。加入蛋白质量为4μg的ECP粗提液,4℃电泳。考马斯亮蓝R250染色。

1.6 ECP蛋白酶(ECPase)的活性分析

参照Heussen^[16]和姜微波^[17]方法,利用复性电泳(G-PAGE)对ECP蛋白酶活性进行分析。制备

表1 TS628菌株胞外产物活性分析

Tab.1 The activities of extra cellular products of *Vibrio harveyi* TS628

样品名称	蛋白质量 (μg)	酶活力						
		脲酶	明胶蛋白酶	卵磷脂酶	脂肪酶	淀粉酶	酪蛋白酶	溶血活性
E ₂₄	6.5	-	+++	-	-	++	++	++
E ₃₆	6.5	-	+++	-	-	++	++	++
E ₄₈	6.5	-	+++	+++	+	+++	++	+++
对照组	0	-	-	-	-	-	-	-

注:+++表示酶活性高;++表示酶活性较高;+表示酶有活性;-表示酶无活性

2.2 ECP的溶血价测定及热稳定性检测

表2可知,哈维氏弧菌TS628菌株的ECP对绵羊红细胞(M)不敏感,其溶血价都为0;对罗非鱼红细胞(L)有较敏感的溶血效应,其中E₄₈的溶血活性最高,为256;E₃₆和E₂₄的溶血活性较弱,溶血价均为4。ECP经高温处理后,几乎丧失溶血活性,表明TS628菌株胞外产物中的溶血性物质具有热不稳定性。

2.3 ECP粗提蛋白的分离

ECP蛋白的SDS-PAGE图谱如图1所示。从凝胶图谱上可以看出E₂₄、E₃₆和E₄₈显示出的蛋白条带

“分离胶”时加入0.1%的明胶作为底物蛋白。电泳后,用复性缓冲液(2% TritonX-100, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)漂洗2次,每次15min。再将胶板置于孵育液(0.1 mol/L 甘氨酸、5 mmol/L CaCl₂, 调pH为4.5、7.0、9.5三种孵育液)37℃下保温3h。考马斯亮蓝R250染色30min,然后放入脱色液(甲醇:乙酸:双蒸水=3:1:6)至酶活性区域清晰透亮。

2 结果

2.1 哈维氏弧菌TS628菌株胞外产物的活性分析

以杯碟法测定E₂₄、E₃₆和E₄₈的酶活性表明,E₂₄和E₃₆具有酪蛋白酶、明胶蛋白酶和淀粉酶活性,但不具有脂肪酶、尿酶和卵磷脂酶活性;E₄₈具有酪蛋白酶、明胶蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、卵磷脂酶等多种酶活性,但不具有尿酶活性。等蛋白质量的E₂₄、E₃₆和E₄₈中,明胶酶蛋白酶活性较强。另外,E₂₄、E₃₆和E₄₈对羊红细胞均具有一定的溶解能力(表1)。

数基本一致,表明E₂₄、E₃₆和E₄₈的蛋白成分几乎相同,其中有4条蛋白质条带最明显,其分子质量分别为60、35.0、31和27ku。

表2 TS628菌株胞外产物的溶血价测定

Tab.2 The hemolytic titer of ECP of *Vibrio harveyi* TS628

分析对象	ECP对M的溶血价	ECP对L的溶血价
E ₄₈	0	256
E ₃₆	0	4
E ₂₄	0	4

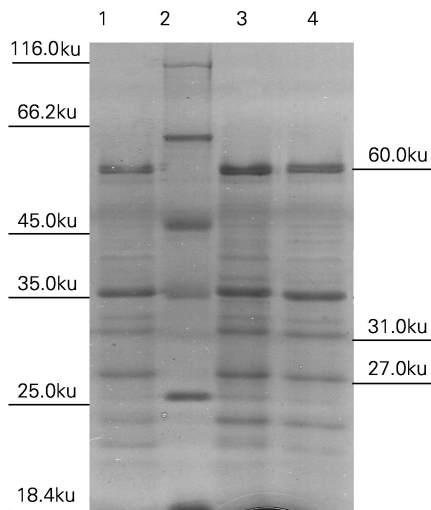


图 1 TS 628 菌株 ECP 蛋白的 SDS PAGE 图谱

Fig. 1 SDS PAGE of ECP protein of *Vibrio harveyi* TS-628

1. E₂₄粗提蛋白; 2. 蛋白质分子质量标准

3. E₃₆粗提蛋白; 4. E₄₈粗提蛋白

1. E₂₄; 2. molecular mass marker; 3. E₃₆; 4. E₄₈

2.4 ECP 蛋白酶 (ECPase) 的活性

2.4.1 哈维氏弧菌 TS 628 菌株的 ECPase 活性

G PAGE 法对 E₂₄, E₃₆ 和 E₄₈ 的蛋白酶活性研究表明(图 2): (1)在同一 pH 条件(pH 4.5, 7, 9.5), 这三者的蛋白酶带基本一致, 只是蛋白酶活性存在差异,

在 25~ 31 ku 之间, E₄₈ 的蛋白酶活性最强, E₂₄ 相对稍弱, E₃₆ 的酶活性最弱; 在 66.2~ 116 ku, E₃₆ 和 E₂₄ 的蛋白酶活性都很强, E₄₈ 的酶活性最弱; 三者均含有活性较强、分子质量为 60 ku 的蛋白酶。(2)三者中不同分子质量的蛋白酶显示出不同程度的 pH 依赖性。66.2~ 116 ku 之间的蛋白酶在不同 pH 条件(pH 4.5, 7, 9.5)下, 酶活性没有太大变化。pH 4.5 时, 蛋白酶活性较强。25~ 31 ku 之间的蛋白酶活性则表现出较大的 pH 依赖性。当 pH < 7 时, 蛋白酶活性最强; pH ≥ 7 时, 蛋白酶活性减弱。据此, 可认为哈维氏弧菌的胞外蛋白酶在 pH < 7 时, 水解作用效率高, 表现出较强的活性; 当 pH = 7.0 时蛋白酶的酶种类与 pH < 7 时相似, 只是活性稍弱; 而 pH > 7 时, 25~ 31 ku 之间的蛋白酶活性受到抑制。

2.4.2 哈维氏弧菌 TS 628 菌株和其它 4 种弧菌的 ECPase 活性

由上可知, 哈维氏弧菌 TS-628 菌株的 ECPase 活性在 pH 4.5 时最强, 图 3 比较了在 pH 4.5 时 TS 628 菌株与副溶血弧菌、费氏弧菌、河流弧菌、溶藻弧菌的 ECPase 活性, 可以看出: 5 种弧菌的 ECPase 酶谱的差异较大, 相同的蛋白酶带主要集中在 25~ 31 ku 之间, 其中副溶血弧菌的 ECPase 的种类较多, 分子质量范围也较宽(25~ 116 ku), 且均表现出很强的活性。费氏弧菌、河流弧菌和溶藻弧菌这 3 种弧菌的 ECPase 酶谱差异较小, 相同的蛋白酶带较多, 活性较强的蛋白酶都主要集中在 25~ 31 ku 之间。哈维氏弧菌相对其它 4 种弧菌的 ECPase 酶带较少, 活性也较弱。

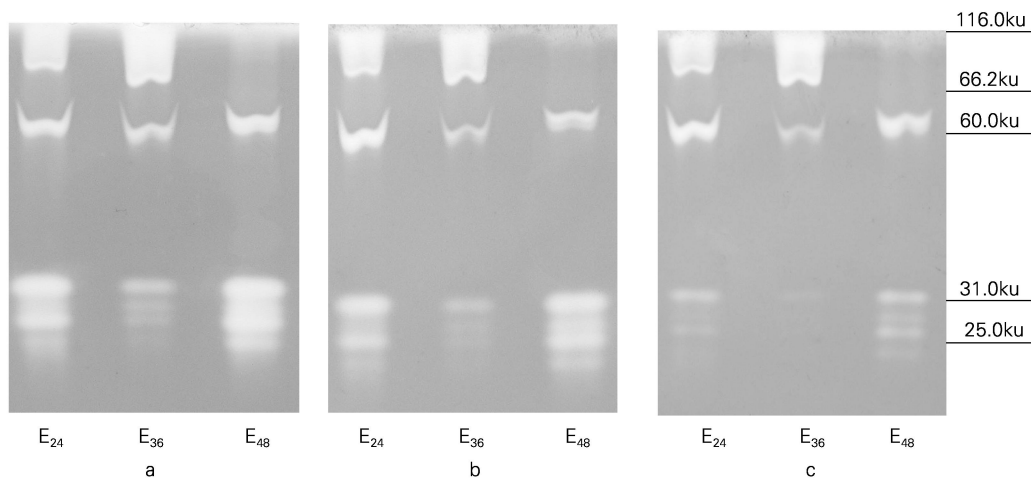


图 2 TS 628 菌株在不同 pH 条件下的 ECPase 种类及活性

Fig. 2 The activities and sorts of the ECPase in *Vibrio harveyi* TS 628 at different pH

a. pH 4.5; b. pH 7; c. pH 9.5

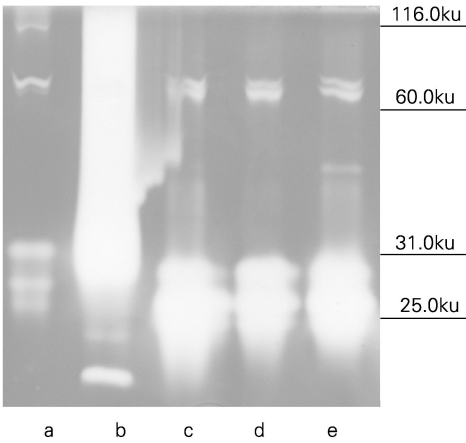


图3 pH 4.5 时 5 种弧菌的 ECPase 种类及活性
Fig. 3 The activities and sorts of the ECPase of 5 species in *Vibrio* at pH 4.5

a. 哈维氏弧菌; b. 副溶血弧菌; c. 费氏弧菌
d. 河流弧菌; e. 溶藻弧菌

a. *Vibrio harveyi*; b. *V. parahaemolyticus*
c. *V. fischeri*; d. *V. fluvialis*; e. *V. alginolyticus*

3 讨论

关于弧菌属细菌胞外产物的致病性研究很多, Inamura^[9]等证实鳃弧菌的胞外产物可致多种鱼类死亡,认为胞外产物中的蛋白酶和外毒素是其主要致病因子。Chowdhury^[18]等对最小弧菌的胞外蛋白酶研究表明,这种蛋白酶可以提高最小弧菌对宿主血管的穿透性,并引起水肿的形成。许兵等^[12]研究了对虾红腿病爆发的原因时发现,副溶血弧菌、溶藻弧菌的胞外产物具有多种酶活性,是对虾致死的主要原因。牟海津等^[3]对副溶血弧菌胞外产物致病性研究表明,副溶血弧菌的多种胞外酶活性是细菌侵染中国明对虾的主要成分之一,其中蛋白酶及耐热性溶血素是影响细菌毒力的重要因素,而其它酶类,如卵磷脂酶、脂肪酶等在感染对虾过程中也起到了重要的辅助作用。本实验首次对海水养殖石斑鱼病原菌哈维氏弧菌胞外产物进行初步探讨,结果表明,哈维氏弧菌胞外产物中也具有多种酶活性以及溶血活性,其中酪蛋白酶及明胶蛋白酶活性较强。由于蛋白酶能分解组织蛋白,溶解纤维蛋白,阻止伤口愈合,从而增强了细菌毒性^[19-21]。可以预测,当病原菌通过自身分泌的蛋白酶干扰了宿主机体的平衡,促进病原菌在宿主组织中的繁殖,并随血淋巴运动到全身各器官,严重破坏凝血系统的酶活性,并与外毒素等联合作用,致使血细胞溶解,最终造成宿主的溃烂死

亡。作者对哈维氏弧菌各种胞外酶活性的测定对于分析其致病作用提供了证据,但其致病机理有待进一步研究。

哈维氏弧菌是一种海水鱼类养殖中常见的条件致病菌,其致病性与鱼体的生理状态及养殖水域环境的理化条件直接相关。

从复性电泳技术对哈维氏弧菌 TS 628 菌株胞外蛋白酶活性分析结果可以看出,胞外蛋白酶在 pH < 7 时表现出较强的活性,种类也较多;而在 pH > 7 时,蛋白酶活性则受到抑制。这与钟硕良等^[22]研究相似,该结果认为,哈维氏弧菌在较低的酸碱度 (pH < 7.6) 下生长较快,对虾仔虾也较易感染发光病。毛芝娟^[23]等在哈维氏弧菌培养工艺的研究中也指出,酸性的培养条件有利于哈维氏弧菌的生长。在作者的调研与实验中,哈维氏弧菌一般在高温季节引起疾病的爆发,可能是因为,养殖区的网箱布局不合理,水流不畅,养殖密度过大,残饵及养殖动物的排泄物日益积累,丰富的有机质发酵分解导致水体中的 pH 也随之下降,这样,一方面促进病原菌的生长速度,导致水体中病原菌数量增多,另一方面,由于胞外蛋白酶可以破坏宿主的体质及免疫系统,当水体 pH < 7 时,胞外蛋白酶的活性逐渐增强,导致宿主抵抗力下降,从而利于病原菌的进一步侵染。

副溶血弧菌、溶藻弧菌、费氏弧菌及河流弧菌均被认为是较重要的水产病原菌,国内外有关这 4 种弧菌胞外产物的致病机制研究较为深入。诸多研究结果表明,胞外蛋白酶在这 4 种弧菌的致病过程中均直接发挥了致病作用,是决定细菌毒力的重要因素。作者试分析比较哈维氏弧菌与这 4 种常见致病弧菌的胞外蛋白酶活性。结果表明,哈维氏弧菌相对于其它 4 种弧菌的胞外蛋白酶带较少,活性也相对较弱。但蛋白酶活力的减弱是否会直接影响病原菌的毒力,现尚不清楚,还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴后波,潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 89-93.
- [2] 李育英,李槿年. 致病性弧菌致病机理研究进展[J]. 水利渔业, 2003, 23(1): 56-57.
- [3] 牟海津,李筠. 副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析[J]. 海洋与湖泊, 2000, 31(3): 273-279.
- [4] 纪荣兴,邹文政,张坤宁,等. 美国红鱼“腐皮病”病原的初步研究[J]. 海洋科学, 2003, 27(8): 1-4.
- [5] 张朝霞,王军,苏永全,等. 斑节对虾病原菌胞外产物的致病性研究[J]. 海洋学报, 2000, 22(5): 94-99.
- [6] 王保坤,余俊红,李筠,等. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧

- 菌)的分离与鉴定. 中国水产科学, 2002, 9(1): 52-55.
- [7] 王国良, 金珊, 薛良义. 海水网箱鲈鱼皮肤溃烂病及其病原菌的研究[J]. 黄渤海海洋, 2000, 18(3): 85-89.
- [8] Saeed M O. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait [J]. *Aquac*, 1995, 136: 21-29.
- [9] 覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 297-302.
- [10] 张庆华, 瞿小英, 熊清明, 等. 大黄鱼体表溃烂症病原菌的鉴定[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(3): 233-237.
- [11] Inamura H, Muroga K, Nakai T. Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum* [J]. *Fish Pathology*, 1984, 19(2): 89-96.
- [12] 王多宁, 赵雁武. 考马斯亮蓝微盘比色法测定蛋白质含量[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(6): 528-531.
- [13] 许兵, 纪伟尚. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究[J]. 海洋学报, 1993, 15(1): 98-106.
- [14] 邱德全. 嗜水气单胞菌外分泌物的致病性[J]. 中山大学学报论丛, 1996, 增刊: 91-97.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第2版)[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [16] Christa H, Eugene B D. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates[J]. *Analytical Biochemistry*, 1980, 102: 196-202.
- [17] 姜微波. 凝胶电泳分析蛋白酶活性的技术改进[J]. 植物学通报, 2002, 19(5): 607-610.
- [18] Chowdhury M A R, Miyoshi S. Purification and characterization of a protease produced by *Vibrio mimicus* [J]. *Infect Immun*, 1990, 58: 4 195-4 162.
- [19] 吴后波, 潘金培. 海水养殖真鲷弧菌病原菌外毒素的分离、纯化及生物学活性[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(1): 83-88.
- [20] 林克冰, 周宸. 海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究[J]. 海洋科学, 1999, 4: 81-85.
- [21] Kanemori Y, Nakai T, Muroga K. The role of extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum* [J]. *Fish Pathol*, 1987, 22(3): 153-158.
- [22] 钟硕良. 环境因子对发光细菌的生长及日本对虾仔虾感染死亡率的影响[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 41-44.
- [23] 毛芝娟, 楼丹. 哈维氏弧菌 Y91301 菌株培养工艺的研究[J]. 水产科学, 2004, 23(3): 7-9.

Study on the extra cellular products (ECP) of the pathogenic *Vibrio harveyi* isolated from the farmed groupers

CHEN Yafang, WANG Jun, SU Yong-quan, QIN Ying-xue, WANG Shifeng
(Department of Oceanography and Environment, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Jan., 16, 2006

Key words: *Epinephelus awoara*; *Epinephelus coioides*; *Vibrio harveyi*; extra cellular products (ECP); ulcer disease

Abstract: A pathogenic strain of *Vibrio harveyi* named TS-628 was isolated from the farmed *Epinephelus awoara* and *Epinephelus coioides* suffering from ulcerated syndrome. The extra cellular products (ECP) of the bacteria were found to show gelatinase, amylase, lipase, phospholipase, caseinase activities and haemolytic property. ECP samples obtained from the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) after different incubation periods produced almost the same bands. The molecular weights of the proteins in these ECP mainly ranged from 25.0 ku to 66.2 ku. The extracellular proteinase (ECPase) activities of *V. harveyi* and the other four *Vibrio* species (*V. fischeri*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*) were compared by SDS gelatin polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-GPAGE) and stained with coomassie brilliant blue R-250. The results from the SDS-GPAGE of these ECPases indicated that: (1) For *V. harveyi*, the activity and the sorts of ECPase under acidic condition were higher and more than those under basic condition; (2) In the same case, ECPase of *V. parahaemolyticus* had the strongest activity and various styles as well as wide molecular weight range among the five *Vibrio* species, and it seemed that there are the lower proteinase activity and less sorts of the ECPase in *V. harveyi*.

(本文编辑: 刘珊珊)