

哈维氏弧菌 GYC1108-1 胞外蛋白酶的制备 及免疫原性研究

郝贵杰 沈锦玉 潘晓艺 尹文林 曹 铮

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

摘 要 胞外蛋白酶(ECPase)是哈维氏弧菌 GYC1108-1 胞外产物的主要致病因子,经鉴定其为半胱氨酸蛋白酶,分子量约 55 kD,能够分解脱脂奶中的酪蛋白,命名为 1108-ECPase。本实验建立了胞外蛋白酶活性平板法检测 1108-ECPase 和 YZ-ECPase 的相对酶活(YZ 为由本实验室构建的能够分泌目的蛋白酶的重组菌),并利用这个方法确定了细菌分泌 ECPase 达最高峰的培养时间为 36h,粗提 ECPase 最适的饱和硫酸铵浓度为 70%。GYC1108-1 和 YZ 培养上清经硫酸铵盐析, Sephadex G-25 凝胶过柱后,得到较为纯化的 1108-ECPase 和 YZ-ECPase。选择白油、蜂胶和弗氏 3 种不同佐剂与适量抗原混匀,分别免疫 3 只 ICR 小鼠,并设不加佐剂免疫组及空白组作为对照。3 次免疫后制备小鼠血清,间接 ELISA 测定抗体效价,除空白对照外,其他 8 组小鼠的免疫血清效价达 $1:1.6 \times 10^4 \sim 1:2.56 \times 10^5$,免疫组的效价从高到低依次为弗氏 > 白油 > 蜂胶 > 不加佐剂,不同佐剂的免疫效果依次为:弗氏 > 白油 > 蜂胶。免疫印迹实验结果表明,小鼠血清在 55 kD 处有明显的反应条带。

关键词 哈维氏弧菌 胞外蛋白酶 佐剂 间接 ELISA 免疫印迹

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)03-0107-06

Preparation and immunogenicity of extracellular proteinase of *Vibrio harveyi* GYC1108-1

HAO Gui-jie SHEN Jin-yu PAN Xiao-yi YIN Wen-lin CAO Zheng

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

ABSTRACT *Vibrio harveyi* is a kind of important pathogenic bacteria for seawater animals and can bring about severe loss to their culture production. *V. harveyi* strain GYC1108-1, which was isolated from diseased *Pseudosciaena crocea* in Zhejiang Province in 2003, was identified after morphological observation, biochemical characteristic analysis, 16sRNA and HSP60 gene sequence detection. Earlier research in our laboratory demonstrated that the extracellular protease(ECPase) was the major virulent factor of GYC1108-1 and was identified as cysteine protease with a molecular mass of 55 kDa as estimated by SDS-PAGE. The protease can decompose the casein of degrease milk and was named as 1108-ECPase. The method of solid LB culture medium containing 1% skim milk was established to detect relative activities of 1108-ECPase and YZ-ECPase (YZ is a recombinant bacteria that can express the target ECPase). The opti-

imum cultivation time of GYC1108-1 and YZ excreting ECPase was 36 h and the optimal concentration of ammonium sulfate for ECPase purification was 70% for the above-mentioned method. In this study, 1108-ECPase and YZ-ECPase were purified by 70% ammonium sulfate and Sephadex G-25 gel filtration for antigens standby. Three different substances A, B and C were chosen to be adjuvants. A was a common adjuvant which was a mixture of white oil and Tween-80; B was propolis adjuvant and C was Freund's adjuvant. The purified 1108-ECPase and YZ-ECPase antigens were mixed with A, B and C before being applied separately to immunize 3 ICR mouse. The adjuvant-free and blank treatments were designed as control. There were nine treatments in the immunization test. The immune sera of the mouse were collected after three immunizations. Except the blank control, multi-clone antibodies showed high ELISA titers in the sera of eight treatments, which were between $1 : 1.6 \times 10^4 \sim 1 : 2.56 \times 10^5$. The titers of immune sera in different treatments were ranked as $C > A > B > \text{adjuvant-free}$, and it is suggested that the adjuvants chosen follows this effectiveness sequence. The result of Western blot revealed one clear band in ECPase, which had a molecular mass of 55 kDa as tested by mouse anti-serum. These results indicated that the prepared 1108-ECPase and YZ-ECPase had good immunogenicity, and this work has provided some basic knowledge for further study on genetic engineering vaccines.

KEY WORDS *Vibrio harveyi* ECPase Adjuvant Indirect ELISA Western blot

哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 是引起水产动物致病的一种重要病原,能引起鱼、虾等多类海水养殖动物致病,造成很大的危害(毛芝娟等 2002; 陈献稿等 2004; Karunasagar *et al.* 1994)。笔者所在实验室于 2003 和 2004 年分别从浙江台州深水网箱养殖大黄鱼患病鱼体内分离获得较纯的细菌。经生化鉴定及 16S rRNA 和热激蛋白(HSP60)鉴定证实为哈维氏弧菌,并命名为 GYC1108-1。通过对该菌进行的理化特性及致病性研究,证明 GYC1108-1 株分泌的胞外产物对大黄鱼有致死作用。底物电泳复性染色后显示只有 1 条透明带,说明 GYC1108-1 只分泌 1 种胞外蛋白酶(ECPase),分子量约 55 kDa,经蛋白酶抑制试验证实该蛋白酶为半胱氨酸蛋白酶。对大黄鱼的攻毒试验结果表明,该蛋白酶对大黄鱼有致死作用,但若被热灭活或被白酶 K 消化,便失去毒性。上述研究结果已有报道(Shen *et al.* 2007)。为了更好地研究该 ECPase 的致病机理及研制基因工程亚单位疫苗,本实验室利用此酶能够消化脱脂奶的特性,采用表型克隆的方法获得了能够稳定分泌该 ECPase 的基因工程菌株,命名为 YZ,这为疫苗的研制及该病的控制提供了基础材料。但是 GYC1108-1 所分泌的 ECPase 对于受免动物能够产生多大免疫原性,以及 YZ 与 GYC1108-1 分泌的 ECPase 是否具有相似的免疫原性,它们与免疫佐剂相混合是否能产生更好的免疫作用均未有报道。本文针对这些问题做了一些研究。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及免疫动物

哈维氏弧菌 GYC1108-1 由本实验室分离鉴定, YZ 为利用表型克隆的方法获得的能分泌表达胞外蛋白酶的重组菌,由本实验室构建。56 d 龄雌性 ICR 小鼠购自浙江大学医学院实验动物中心。

1.2 胞外蛋白酶活性平板法检测

先配制含 1.2% 琼脂粉的 TSA 和 LB 培养基,加热溶解后,加入终浓度为 1% 的脱脂牛奶,分至灭菌培养

皿中冷却。琼脂凝固之后,用打孔器在琼脂上打孔,孔径约 8 mm,并用少量热琼脂覆盖孔底,每孔加入 30~50 μl 粗提的 ECPase,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱温育 24 h,加入 10% 的三氯乙酸终止,观察孔周围是否出现透明圈,有透明圈者为阳性,同时以液体培养基作为对照。

1.3 最适硫酸铵饱和度的确定

各取 50 ml 含 1.5% NaCl 的 TSB 培养基培养的 GYC1108-1 和 YZ,5 000 r/min 离心 15 min,分别取上清,磁力搅拌下分别缓慢加入 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 饱和度的硫酸铵,4 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h,8 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 1 ml Tris-HCl (50 mmol/L,pH 7.8) 溶解,同样的 Tris-HCl 缓冲液透析过夜,并用 1.2 法检测蛋白酶活性。

1.4 最大量 ECPase 分泌时间的测定

将培养 24 h 的 GYC1108-1 和 YZ 菌落分别接种到多瓶 50 ml 含 1.5% NaCl 的 TSB 和 LB 培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 8、12、24、36、48、60 和 72 h,用 1.3 中确定的最适饱和度硫酸铵进行 ECPase 粗提,再用 1.2 方法测定相对酶活,以确定细菌分泌蛋白酶的最佳时间。

1.5 ECPase 的提取与纯化

大量培养 GYC1108-1 和 YZ 各 500 ml,28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床摇至最适时间。8 000 r/min 离心 10 min,分别取上清,磁力搅拌下缓慢加入 pH 7.0 饱和度硫酸铵至最适饱和度,4 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h。8 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 3 ml Tris-HCl(50 mmol/L,pH 7.8) 重悬,同样的 Tris-HCl 缓冲液透析过夜,并用 1.2 中方法测定相对酶活。

制备 Sephadex G-25 层析柱,柱长 70 cm,直径 1.6 cm。ECPase 经上述硫酸铵粗提并透析后,约 7 ml,用 0.45 μm 滤膜过滤后上样。用 pH 7.4 PBS 洗脱,自动采样器收集洗脱峰。用 1.2 方法测定相对酶活,目的蛋白酶用 PEG6000 浓缩,采用考马斯亮蓝法测蛋白浓度,标记为 1108-ECPase 和 YZ-ECPase,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存作为免疫原备用。

1.6 免疫佐剂的选择

为了证实 ECPase 是否具有免疫原性,以及与免疫佐剂相混合是否能产生更好的免疫作用,选取了 3 种不同佐剂及不加佐剂分别与 ECPase 混匀免疫 ICR 小鼠。为了比较各佐剂的效果,稀释时取相同的抗原量及最终免疫量也一致。各佐剂处理如下:

白油佐剂:油相为 92%(V/V)10 号白油加 6%(V/V)司本,并加 2%(m/V)硬脂酸铝作为保护剂,水相为含抗原的稀释液加 4% Tween-80,水相:油相为 1:3 乳化。

蜂胶佐剂:1 g 蜂胶加 4 ml 酒精,浸泡过夜,5 000 r/min 离心 10 min,取上清过滤,用 PBS 稀释至约 30 mg/ml,4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

弗氏佐剂:包括完全和不完全弗氏佐剂,购自 Sigma 公司。

1.7 动物免疫

取适量的抗原,用 0.5% 甲醛灭活 24 h,进行适当的稀释,分别与上述的 3 种佐剂充分混匀乳化,腹部皮下分点注射 ICR 小鼠,每组注射 3 只小鼠,每只注射 200 μl (含抗原 100 μg),每只小鼠免疫 3 次。

1.8 鼠抗 ECPase 血清抗体效价的测定

ICR 小鼠免疫 3 次后,摘眼球取血,放 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,血清自然析出。5 000 r/min 离心 10 min,将上清吸出备用,间接 ELISA 方法测定小鼠血清效价。

(1)包被 取纯化的 ECPase 用包被液 CBS(pH 9.6 碳酸盐缓冲液)稀释到 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,包被 96 孔酶标板,100 $\mu\text{l}/\text{孔}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。(2)封闭 取出过夜的 ELISA 板,用 PBST 充分洗涤 3~4 次,每次 3~5 min。用含

10%小牛血清的PBS封闭,200 μl /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭3 h,同上洗涤。(3)一抗孵育 每孔加入100 μl 鼠抗血清(1:1 000开始作系列倍比稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h,同上洗涤。(4)二抗孵育 每孔加入50 μl 工作浓度(1:1 000)的羊抗鼠IgG酶标抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h,同上洗涤。(5)显色 加入磷酸-柠檬酸缓冲液配制的OPD底物液,每孔50 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色10~15 min。(6)终止并读数 每孔加50 μl 2 mol/L 硫酸终止反应。应用酶联免疫阅读仪读出OD₄₉₀值。P/N \geq 2.1者判为阳性,P/N<2.1者判为阴性。

1.9 免疫印迹(Western blot)检测 ECPase 的免疫原性

SDS-PAGE 电泳采用不连续缓冲液垂直电泳系统,浓缩胶为5%,分离胶为12%。电泳及免疫印迹参考《蛋白质技术手册》进行(汪家政等 2000)。一抗为1:200稀释的鼠血清,二抗为1:500的羊抗鼠IgG酶标抗体。

2 结果

2.1 ECPase 酶活平板法的建立

采用1%脱脂奶加琼脂平板法,对哈维氏弧菌 GYC1108-1 和分泌目的蛋白 ECPase 的重组菌 YZ 的培养上清粗提产物进行酶活性检测。结果表明,所分泌的 ECPase 均具有酪蛋白酶活性,能分解牛奶中的酪蛋白,在孔的周围出现明显的透明圈,而对照没有。结果见图1。

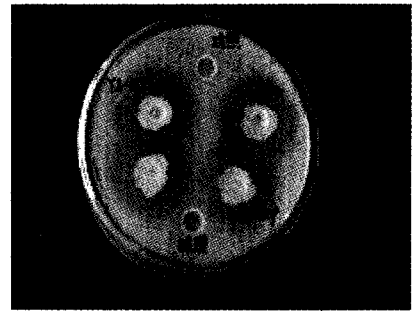


图1 平板法测定 ECPase 酶活结果

Fig. 1 Activity of ECPase tested by plate method

2.2 最适硫酸铵饱和度的确定

通过对30%~100%梯度的硫酸铵饱和度所沉淀回收的 ECPase 酶活检测得出,70%饱和度的硫酸铵沉淀获得的 GYC1108-ECPase 和 YZ-ECPase 的酶活性较高(表1)。

表1 不同硫酸铵饱和度回收蛋白酶试验结果

Table 1 The results of ECPase purification by ammonium sulfate at different concentrations

透明圈直径(mm) Diameter of transparent circle	不同的硫酸铵饱和度(%) Different concentrations of ammonium sulfate							
	30	40	50	60	70	80	90	100
1108-ECPase	0	10	13	17	23	20	16	11
YZ-ECPase	0	11	13	16	24	20	15	11

2.3 菌液分泌 ECPase 的最适时间

细菌培养的 ECPase 在8 h 时出现轻微蛋白酶活性,然后酶活迅速增加,到36 h 时达到最高峰,并维持一段时间,60 h 检测时酶活已开始下降(图2)。

2.4 ECPase 的纯化及浓度测定结果

用饱和硫酸铵法粗提 GYC1108-1 及 YZ 的 ECPase 后,透析后经 Sephadex G-25 层析柱过柱纯化,收集洗脱峰用1.2 中方法测定酶活。结果显示,透明圈较大并且各管圈的大小较均一,说明二者的 ECPase 得到较好的纯化。将各收集管合并后浓缩,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,YZ-ECPase 为7.7 mg/ml,GYC1108-ECPase 为6.9 mg/ml。

2.5 小鼠免疫实验结果

选用3种不同免疫佐剂(蜂胶、白油和弗氏)分别与适量的纯化的 ECPase 免疫小鼠,方法按1.8及1.9。

利用间接 ELISA 方法测定所制备的小鼠血清效价并比较免疫效果。阴性对照为未免疫 ICR 小鼠血清作为一抗, 显色结果 OD₄₉₀ 值均小于 0.05 (表 2)。

表 2 不同免疫佐剂的小鼠血清效价

Table 2 The titers of anti-sera from mouse immunized by ECPase with different adjuvants

佐剂 Adjuvant	包被抗原 Coating antigen	小鼠血清 ELISA 效价 ELISA titers of mouse immune sera	
		免疫原为 1108-ECPase 1108-ECPase as immunogen	免疫原为 YZ-ECPase YZ-ECPase as immunogen
弗氏佐剂 Freund's adjuvant	1108-ECPase	1 : 2.56 × 10 ⁷	1 : 1.28 × 10 ⁵
蜂胶佐剂 Propolis adjuvant	1108-ECPase	1 : 6.4 × 10 ⁴	1 : 3.2 × 10 ⁴
白油佐剂 White oil adjuvant	1108-ECPase	1 : 1.28 × 10 ⁵	1 : 6.4 × 10 ⁴
不加佐剂 Adjuvant-free	1108-ECPase	1 : 1.6 × 10 ⁴	1 : 8 × 10 ³
弗氏佐剂 Freund's adjuvant	YZ-ECPase	1 : 1.28 × 10 ⁵	1 : 2.56 × 10 ⁵
蜂胶佐剂 Propolis adjuvant	YZ-ECPase	1 : 6.4 × 10 ⁴	1 : 1.28 × 10 ⁵
白油佐剂 White oil adjuvant	YZ-ECPase	1 : 1.28 × 10 ⁵	1 : 1.28 × 10 ⁵
不加佐剂 Adjuvant-free	YZ-ECPase	1 : 3.2 × 10 ⁴	1 : 3.2 × 10 ⁴
空白对照 Blank control	CBS	—	—

2.6 免疫印迹

免疫印迹结果显示, 以鼠抗血清作为一抗时, 胞外蛋白酶与鼠血清在 55 kDa 处发生特异性免疫反应。而在 38 kDa 处有微弱的反应。说明该胞外蛋白酶有很好的免疫原性(图 3)。

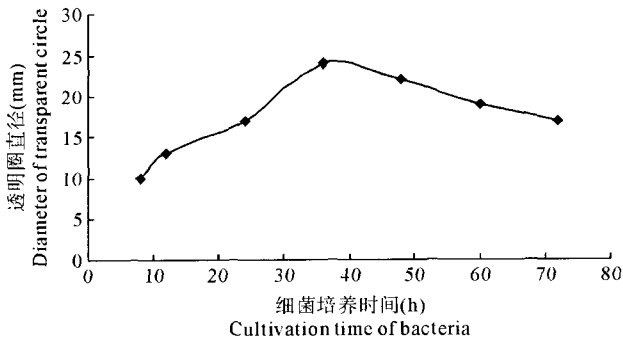


图 2 不同培养时间 ECPase 的相对酶活性

Fig. 2 The relative activity of ECPase for different cultivation time

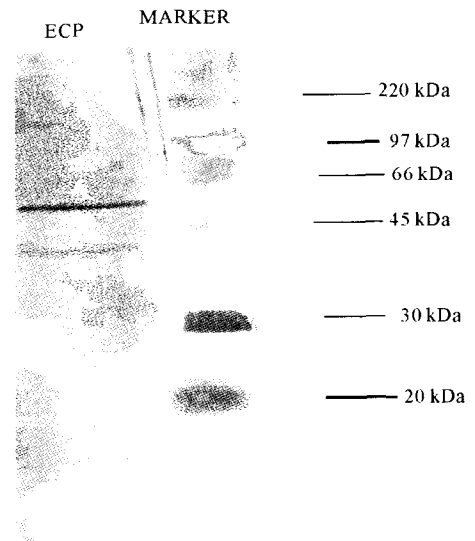


图 3 鼠抗血清的 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of mouse anti-sera

3 讨论

大量研究证明, 致病菌的蛋白酶与病原菌对宿主的入侵、损害及致死等机制紧密相关。因此对致病菌蛋白酶的研究已成为病害研究的热点。弧菌是海水动物主要致病菌, 近年来关于弧菌分泌的胞外蛋白酶致病作用越来越受到重视(Zhang *et al.* 2000; Shen *et al.* 2007; 覃映雪等 2008)。弧菌胞外蛋白酶研究最多的是鳃弧菌(Kanemofi *et al.* 1987; Hiroki *et al.* 1985)。溶藻弧菌分泌的胞外产物已经被证实对大黄鱼和对虾

有毒性作用(Lee *et al.* 1995;金 珊等 2004)。哈维氏弧菌已经有报道的蛋白酶有金属蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶(Fukasawa *et al.* 1988a,1988b;Lee *et al.* 1999)。其中,以半胱氨酸蛋白酶研究较为清楚,而且已经证实了该蛋白酶为哈维氏弧菌 820514 株的主要致病因子,对虾有直接致死作用。本实验室通过对哈维氏弧菌 GYC1108-1 株的胞外产物进行分析和鉴定,确定其胞外蛋白酶为半胱氨酸蛋白酶,结果另文报道。

为了更深入的研究哈维氏弧菌 GYC1108-1 所分泌的 ECPase 的致病机理及控制该病的发生,本实验室利用表型克隆的方法构建了能够稳定分泌该 ECPase 的重组菌 YZ。本实验利用脱脂奶活性平板法证实了二者所分泌的 ECPase 具有相似的酶活性,且最大量分泌该酶的时间为 36 h,这与该菌人工感染大黄鱼发病及死亡高峰时间为 36~38 h 是一致的,这也说明该酶为 GYC1108-1 主要的致病因子。通过饱和硫酸铵法粗提了 1108-ECPase 和 YZ-ECPase,并用活性平板法测定最适的硫酸铵饱和度为 70%。用 Sephadex G-25 层析柱过柱进一步纯化,得到较纯的蛋白酶。

用纯化的蛋白酶作为免疫原进行小鼠免疫实验,初步研究了 GYC1108-1 和 YZ 所分泌的胞外蛋白酶的免疫原性。实验结果表明,除空白对照外,其他 4 组小鼠的免疫血清效价达 $1:1.6 \times 10^4 \sim 1:2.56 \times 10^5$,且各组血清与另一种不同免疫原的交叉反应效价与相应的免疫原效价差异不大,说明所提纯的两种蛋白酶具有相似的免疫原性,同时也进一步说明表型克隆是成功的。这为进一步研制 ECPase 亚单位疫苗提供了有力的数据。另外,考虑到水产养殖的特殊性,一般在合适的时间进行一次免疫,所以选择合适的免疫佐剂,显得尤为重要。因为当抗原物质混合佐剂注入机体后,能改变抗原的物理性状,可使抗原物质缓慢地释放,延长了抗原的作用时间,佐剂吸附了抗原后,能增加抗原的表面积,使抗原易于被巨噬细胞吞噬。这些作用将大大提高疫苗的免疫效果和时间。本实验选择了弗氏、白油和蜂胶作为免疫佐剂,以小鼠为实验动物进行了佐剂的筛选,根据 ELISA 效价结果可得出不同佐剂的免疫效果依次为:弗氏>白油>蜂胶>不加佐剂,但从小鼠免疫实验得出,白油的免疫毒性较大,会造成免疫部位的腐烂;而弗氏佐剂价格昂贵,临床应用又不太切合实际,所以考虑到使用价格及免疫效果,蜂胶是最适合的免疫佐剂。

参 考 文 献

- 毛芝娟,刘国勇,陈昌福. 2002. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定. 安徽农业大学学报, 29(2):178~181
- 陈献稿,吴淑勤,石存斌,李宁求. 2004. 斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定. 中国水产科学, 11(4):314~317
- 汪家政,范 明主编. 2000. 蛋白质技术手册. 北京:科学出版社
- 金 珊,郑天伦,王国良,赵青松. 2004. 溶藻弧菌胞外产物对大黄鱼的致病性. 中国兽医学报, 24(5):439~441
- 覃映雪,苏永全,陈雅芳,王 军. 2008. 哈维氏弧菌 TS-628 菌株胞外产物(ECP)蛋白酶活性的研究. 海洋水产研究, 29(1):81~85
- Fukasawa, S., Nakamura, K., Kamii, A., Ohyama, Y., and Osumi, M. 1988a. Purification and proteinase from a luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLA-11. *Agric. Bio. Chem.* 52:435~441
- Fukasawa, S., Nakamura, K., Miyahirg, M., and Kurata, M. 1988b. Some properties of two proteinases from a luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLN-108. *Agric. Bio. Chem.* 52:3 009~3 014
- Inamura, H., Nakai, T., and Muroga, K. 1985. An extracellular protease produced by *V. anguillarum*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51 (12):1 915~1 920
- Karunasagar, I., Pai, R., and Malathi, G. R. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203~209
- Kanemofi, Y., Nakai, T., and Muroga, K. 1987. The role of extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathol.* 22:153~158
- Lee, Kuo-kau, and Chen, Yi-ling. 1999. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and a toxic cysteine protease. *Blood Cell, Molecules, and Disease.* 25 (4):180~192
- Lee, K. K., Chen, F. R., and Yu, S. R. 1995. Effects of extracellular products of *Vibrio alginolyticus* on penaeid prawn plasma components. *Letters in Applied Microbiology*, 25:98~100
- Shen, J., Li, X., Pan, X., and Yin, W. 2007. Characterization of major virulent factor produced by pathogenic *Vibrio harveyi*. 见:第二届亚洲网箱水产养殖国际大会论文集, 123~128
- Zhang, X. H., and Austin, B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 23:93~102