

不同毒力溶藻弧菌脂多糖的多态性研究

宣雄智 谢珍玉 周永灿* 王世锋 吴学贵

(海南大学海洋学院 海南省热带水生生物技术重点实验室,海口 570228)

摘要 提取了 10 株不同毒力的溶藻弧菌脂多糖,其中 HN08811、HN08155、HN08813、HN08335、HN07006 为毒力菌株,HN08805、HN08307、HN08156、HN08801 和 TG06003 为非毒力菌株。分别取 10 μg 进行 SDS-PAGE 电泳。结果表明,不同毒力溶藻弧菌脂多糖的电泳条带存在较丰富的多态性,在类脂质 A 区段(分离胶的上半部分),不同菌株间图谱呈片状堆积,多态性难以分辨;在抗原多糖 O 特异性侧链条带区段(分离胶的下半部分),除 HN07006 外,毒力菌株的条带清晰,数目在 7~9 条之间,所有非毒力菌株产生细而密集的可辨条带。本文为一类遗传型的溶藻弧菌毒力菌株的快速鉴别提供了一种新的分子分型指标,也为溶藻弧菌的血清型分型提供了直接理论依据。

关键词 溶藻弧菌 脂多糖 毒力 多态性

中图分类号 Q93.33 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)01-0104-05

The polymorphism of lipopolysaccharides isolated from *Vibrio alginolyticus* strains with different virulence

XUAN Xiong-zhi XIE Zhen-yu ZHOU Yong-can*
WANG Shi-feng WU Xue-gui

(Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology of Hainan Province, College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228)

ABSTRACT Lipopolysaccharides (LPS) were extracted from ten *Vibrio alginolyticus* strains with different virulence. Five of them were virulent strains, named as HN08811, HN08155, HN08813, HN08335, and HN07006 and the others were non-virulent strains, named as HN08805, HN08307, HN08232, HN08201, and TG06003. The results of SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide polyacrylamide gel electrophoresis) with 10 μg LPS showed that LPS of *V. alginolyticus* strains with different virulence had abundant polymorphism. The polymorphism of lipid A section of each LPS was difficult to distinguish. However, for the O-antigen section, 7~8 clear bands of LPSs from virulent strains were observed except for HN07006. LPSs from all the non-virulent strains had discernable slender and intensive bands. This method not only creates a new molecular typing method for rapid identification of virulent strains of *V. alginolyticus*, but also provides scientific theoretical data for the analysis of serotype of *V. alginolyticus*.

国家自然科学基金项目(30660144, 30760190)、海南省高校硕士研究生创新科研课题(Hxwsy2008-01)和海南大学 2009 年度科研项目(hd09xm57)共同资助

* 通讯作者。E-mail: zychnu@163.com, Tel: (0898)66289553

收稿日期: 2010-01-14; 接受日期: 2010-05-18

作者简介: 宣雄智(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事水生生物病害防治的研究。E-mail: xuanxiongzi@163.com, Tel: 15248950492

KEY WORDS *Vibrio alginolyticus* Lipopolysaccharides (LPS) Virulence Polymorphism

溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* 为我国南方特别是海南海水养殖系统的主要病原(朱传华等 2000;刘洪等 2007),溶藻弧菌不同菌株之间的毒力相差甚远,其中有的菌株可以作为益生菌,它们不仅不会使海水养殖动物患病,而且能明显降低杀鲑气单胞菌 *Aeromonas salmonicida* 等病原对鱼类的感染能力(Austin *et al.* 2005);而有的菌株则是海水养殖动物的常见病原,对海水养殖鱼类、虾蟹类和贝类都造成了十分严重的危害(李永芹等 2004;陈萍等 2009)。

脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,又称为内毒素,其结构包括核心多糖、抗原多糖 O-特异性侧链和类脂 A 共 3 部分(Schroemm *et al.* 2000)。LPS 有独特的免疫特性,不仅对机体的体液免疫应答具有良好的作用,而且对机体的非特异性免疫功能也有促进作用(简纪常等 2004;张伟妮等 2008;孙宝剑等 2001)。细菌细胞壁中的 LPS 成分在其感染的发病机制中起着十分重要的作用(周永灿等 2002),但溶藻弧菌的致病性与脂多糖类型之间的关系还未见报道。

本文对本实验室保存的 10 株不同毒力溶藻弧菌的脂多糖进行 SDS-PAGE 电泳,旨在了解溶藻弧菌脂多糖的多态性以及毒力菌株与非毒力菌株之间脂多糖的差异,以便为溶藻弧菌毒力菌株快速鉴别和溶藻弧菌的血清型分型提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验所用的溶藻弧菌菌株均由本实验室从海南分离并保存,经人工感染确定了毒力株为:HN08811、HN08155、HN08813、HN08335、HN07006;非毒力株为:HN08805、HN08307、HN08156、HN08801、TG06003(庞兴红等 2011)。

1.2 LPS 的提取

参照 Westphal 等(1965)的热酚水法,并进行了适当修改,主要过程如下:收集 5 g 细菌,加 30 ml 磷酸缓冲液进行悬浮,然后反复冻融 3~5 次;加 100 mg 溶菌酶,37 °C 温育 30 min;加 RNase 和 DNase 至终浓度 5 µg/ml,37 °C 温育 3 h;加蛋白酶 K 至终浓度 5 µg/ml,50 °C 温育 2 h,然后置于 68 °C 水浴平衡后加入等体积预热至 68 °C 的酚(95%),68 °C 水浴中振荡作用 20~30 min,冷却至 15 °C 左右,12 000×g 离心 15 min,离心后由上至下分 3 层:上层为含 LPS 的水层,中层为含变性蛋白的酚层,下层为沉淀。小心吸取上层溶液装透析袋,流水冲洗 48 h,然后用蒸馏水透析 2 d,每天换水数次。取下层沉淀以相同方法反复提取两次以上,提取的水层溶液也以相同方法透析。透析后的溶液以聚乙二醇 20 000 浓缩为原来体积的 1/4,1 500×g 离心 30 min,收集上清液,冷冻干燥、称重,置 4 °C 保存备用。

1.3 SDS-PAGE 凝胶配制及电泳

参照《分子克隆实验指南》(第三版)(萨姆布鲁克等 2002)以及 Tsai 等(1982)的方法,配制 12%分离胶 5 ml、5%浓缩胶 3 ml,制备 SDS-PAGE 凝胶板(1.0 mm 厚,分离胶 80 mm×60 mm),并将制备好的凝胶板于室温下垂直放置。将 10 µl 浓度为 1 µg/µl 的 LPS 样品与等体积的 0.1 mol/L 的 Tris-HCl(pH 6.8,含 20 g/L SDS、200 g/L 蔗糖、1%的 2-巯基乙醇和 100 mg/L 溴酚蓝)混合,100 °C 水浴 5 min;冷却后将混合后的 20 µl 样品全部上样。先以 12 mA 进行浓缩胶电泳,样品至分离胶后调节电流至 25 mA 进行分离胶电泳,待溴酚蓝泳动到分离胶底部时,切断电源,结束电泳。

1.4 银染

按常规方法取下电泳后的凝胶板并剥胶,参照徐先栋等(2009)的方法进行银染。具体如下:30%乙醇、

10%冰醋酸和7 g/L高碘酸,22℃固定氧化凝胶20 min;ddH₂O洗涤凝胶3次,每次5 min;30℃下1 g/L的AgNO₃染色30 min;ddH₂O洗涤凝胶1次,10 s;30 g/L Na₂CO₃(4℃或冰浴预冷),0.02%甲醛显色15 min;10%冰醋酸终止显色反应,ddH₂O洗涤凝胶;将银染后的结果拍照,凝胶保存于7%冰醋酸。

1.5 聚类分析

以凝胶上实际显示的条带为依据,绘制电泳条带模式图。根据模式图,以“1”和“0”记录条带的有无,通过多变量统计分析软件包(Multivariate Statistical Program, MVSP)计算遗传相似度,采用算术平均数的非加权成对法(Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average, UPGMA)对样本进行多重聚类分析。

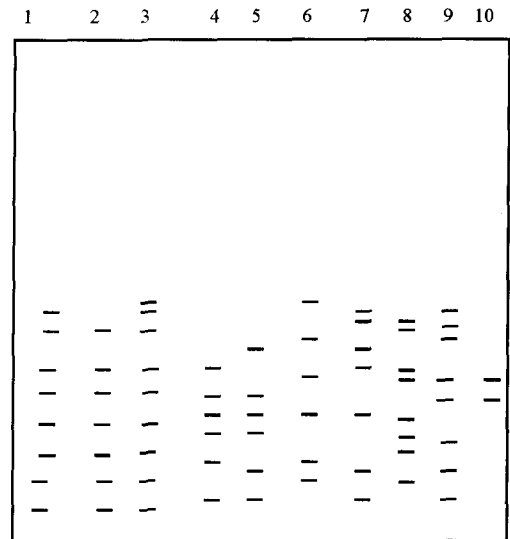
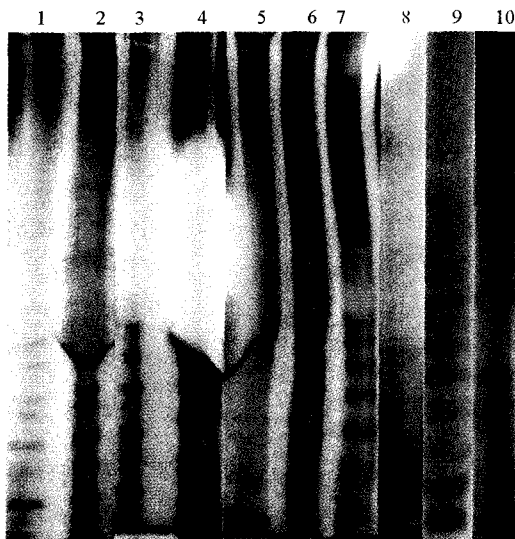
2 结果

2.1 LPS的提取

不同毒力的10株溶藻弧菌分别以2216E海水液体培养基扩大培养,离心并收集菌沉淀,再分别取各株溶藻弧菌10 g,参照Westphal等(1965)的热酚水法提取LPS,从各株溶藻弧菌中分别获得LPS 40~60 μg,将提取的LPS分装后4℃保存。

2.2 LPS电泳图谱分析

10株不同毒力溶藻弧菌LPS的SDS-PAGE电泳图谱见图1,其电泳条带模式图见图2。对该电泳图谱的分析表明,10株溶藻弧菌LPS电泳图谱中,绝大部分图谱的上半部分呈现片状堆积,不能形成明显的条带,有



注:各泳道LPS样品由左至右依次分别来自:1. 毒力菌株HN08155; 2. 毒力菌株HN08335; 3. 毒力菌株HN08813; 4. 毒力菌株HN07006; 5. 非毒力菌株HN08156; 6. 非毒力菌株HN08801; 7. 毒力菌株HN08811; 8. 非毒力菌株HN08805; 9. 非毒力菌株HN08307; 10. 非毒力菌株TG06003

Note: From left to right, LPS samples in the lanes were from the following strains; 1. Virulent strain HN08155; 2. Virulent strain HN08335; 3. Virulent strain HN08813; 4. Virulent strain HN07006; 5. Non-virulent strain HN08156; 6. Non-virulent strain HN08801; 7. Virulent strain HN08811; 8. Non-virulent strain HN08805; 9. Non-virulent strain HN08307; 10. Non-virulent strain TG06003

图1 10株溶藻弧菌LPS电泳图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of LPS from ten

V. alginolyticus strains

图2 10株溶藻弧菌LPS电泳条带模式

Fig. 2 SDS-PAGE model of LPSs from

ten *V. alginolyticus* strains

些还有轻度拖尾现象。而在溶藻弧菌 LPS 电泳图谱下半部分快速迁移的低分子量区,不同毒力菌株 LPS 的电泳图谱具有不同的特点。其中,所有 5 株非毒力菌株 LPS 电泳图谱的特点基本相同,均有数十条着色较为一致的细密条带,没有特别清晰的主带;在 5 株毒力菌株中,除菌株 HN07006 的 LPS 电泳图谱也没有特别清晰的主带外,其余 4 株毒力菌株均有 7~9 条清晰主带,呈深褐色或土黄色,大部分主带的迁移率也基本相同,且无拖尾现象。

2.3 不同菌株 LPS 电泳结果聚类分析

对 10 株不同毒力溶藻弧菌 LPS 的 SDS-PAGE 电泳图谱聚类分析结果表明(图 3),该 10 株溶藻弧菌 LPS 电泳图谱聚类分析的 Jaccard 系数以及 Nei 与 Li 系数基本一致。在毒力菌株中,HN08155、HN08813、HN08335 和 HN08811 聚为一类,并且 HN08155 和 HN08813 遗传相似性最高,相似系数达 0.941;该 4 株毒力菌株之间遗传相似性最低的 HN08155 和 HN08811 的相似系数也达到 0.667;但毒力菌株 HN07006 与其他 4 株毒力菌株差距较远,它与 HN08155 的相似系数仅为 0.143,因此无法与其他 4 株毒力菌株聚为一类。在非毒力菌株中,相互之间的遗传相似性均比较低,差距最近的 HN08156 与 HN08805 的相似系数也只有 0.571,而相距最远 TG06003 与 HN08307 之间的相似系数小于 0.001。

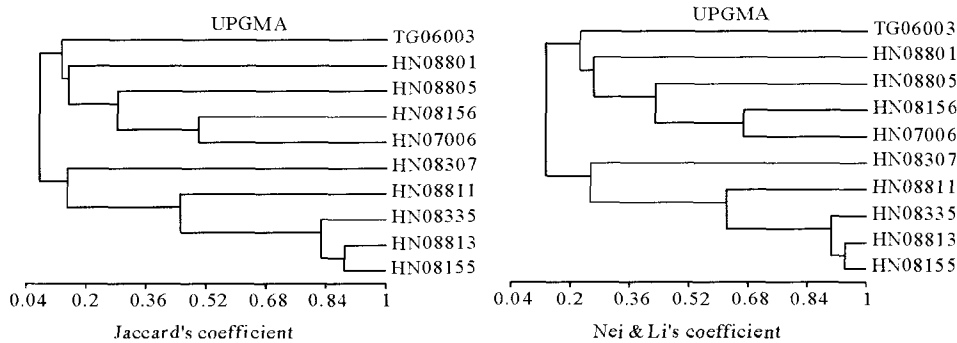


图 3 10 株溶藻弧菌 LPS 样品的 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 UPGMA analysis of LPS samples from ten *V. alginolyticus* strains

3 讨论

LPS 是革兰氏阴性菌的内毒素,由抗原多糖 O-特异性侧链、核心多糖和类脂 A(Lipid A)共 3 个不同的区域组成,它们分布于细菌的最外层。其中,抗原多糖 O-特异性侧链向外,含有由若干个低聚糖的重复单位组成的多糖链,具有特异性;核心多糖分为内核心和外核心,外核心有数种己糖,包括葡萄糖、半乳糖和乙酰氨基葡萄糖等(Mausumee *et al.* 2001;陆书华等 2008);类脂 A 是由焦磷酸键连结的氨基葡萄糖聚二糖链,其上结合有多种长链脂肪酸,类脂 A 耐热,是脂多糖的毒性部分,与细菌致病性有关。类脂 A 无种属特异性,各种 G⁻菌的类脂 A 均相同(柯岩 2000)。

SDS-PAGE 电泳是基于分子量大小、形状和荷电性质而使混合样品产生分离的方法。在 pH 值为中性或近中性的条件下,因蛋白质含有多种不同带电性的侧链基团、带正电荷 α -氨基和带负电荷的 α -羧基,核酸含有大量带负电荷的磷酸基团,且蛋白质和核酸的支链较短,因此,该方法可以对蛋白质和核酸样品产生较好的分离效果。然而,脂多糖由核心寡聚糖、特异性 O-抗原多糖侧链和类脂 A 共 3 部分组成,这些成分中仅含有少数几个带负电荷的磷酸基团,分子中含有较多的脂肪酸链和糖链等分支,因此,以 SDS-PAGE 分离 LPS 样品的效果无法达到以该法分离蛋白质或核酸样品那么好的水平(尹国才等 1993;王加兰等 2009)。为了尽可能达到较好的分离效果,本研究曾进行了大量反复探索,结果在 12 孔的胶上始终无法做到所有样品都获得良好的分离效果。为此,本文图 1 的溶藻弧菌 LPS 电泳图谱采用了相同分离条件下不同批次电泳图的拼接,以期能更好地显示各样品的分离条带。

郝贵杰等(2008)和陆书华等(2008)均认为,LPS 电泳图谱上半部分高分子量区域属于 LPS 的类脂 A 部

分,该部分由于分子量较大,并带有大量电荷,在聚丙烯胶中不易分离,常聚集在凝胶上部呈片状堆积,难以形成明显的条带,无法比较其细微差别,本文对溶藻弧菌 LPS 进行 SDS-PAGE 电泳的结果与陆书华等(2008)和郝贵杰等(2008)的报道基本一致,在各溶藻弧菌 LPS 电泳图谱上半部,没有形成明显的条带,而是呈现片状堆积。

尹国才等(1993)对土拉弗氏菌脂多糖 SDS-PAGE 电泳结果表明,细菌脂多糖 SDS-PAGE 电泳图谱下半部分是 LPS 抗原多糖 O-特异侧链,其侧链多糖重复单位越多,则分子量越大,在 SDS-PAGE 分离胶上显示的条带距离点样孔越近。本文对溶藻弧菌 LPS 进行 SDS-PAGE 电泳的结果与尹国才等(1993)对土拉弗氏菌 LPS 的研究结果相似,因此,我们推测溶藻弧菌 LPS 电泳图谱下半部分也是 LPS 的抗原多糖 O-特异侧链部分。并且,溶藻弧菌 LPS 分子的异质性主要表现在其电泳图谱的下半部分,即经典脂多糖结构的抗原多糖 O-特异性侧链部分,该部分含有一系列分子量大小不一的多糖链条带,与尹国才等(1993)研究的拉弗氏菌 LPS 的电泳图谱特征基本一致,说明溶藻弧菌 LPS 也属于光滑型。

就溶藻弧菌毒力菌株与非毒力菌株 LPS 的 SDS-PAGE 图谱比较而言,在毒力菌株中,除 HN07006 以外的其他 4 株毒力菌株均有 7~9 条清晰主带;而非毒力菌株没有十分清晰的主带,只有数十条着色较为一致的细密的弱染色条带,其原因可能为:毒力菌株抗原多糖 O-特异侧链结构相似,其寡糖重复单位分子量大,数量少且一致,遗传相似性较高;非毒力菌株则相反,它们的抗原多糖 O-特异侧链所含寡糖重复单位分子量小,数量差异大,因此条带细密、与毒力菌株的遗传相似性小。本研究结果还表明,毒力菌株 HN07006 与其他 4 株毒力菌株 LPS 电泳图谱也存在较大差异,聚类分析结果表明,它们之间的遗传相似性较低,无法聚为一类,其原因主要为该菌株与其他 4 株毒力菌株属于不同的遗传型,与庞兴红等(2011)利用特异性引物对上述 5 株溶藻弧菌毒力菌株相关功能基因特异位点进行分型的研究结果相同。

本文研究结果表明,抗原多糖 O-特异侧链的带型多态性可以作为不同毒力溶藻弧菌菌株分型的重要指标之一,可为溶藻弧菌毒力菌株快速鉴别提供一种新的分子分型方法;并且,溶藻弧菌不同毒力菌株的血清型也存在较大差异,为溶藻弧菌的血清型分型提供了直接理论依据。

参 考 文 献

- 陈 萍,王清印,李 健,李吉涛,刘 淇,刘 萍. 2009. 溶藻弧菌对三疣梭子蟹溶菌酶和磷酸酶活性的影响. 渔业科学进展, 30(2): 78~82
- 郝贵杰,沈锦玉,潘晓义,曹 铮,尹文林. 2008. 抗哈维氏弧菌脂多糖单克隆抗体的制备及其鉴定. 上海水产大学学报, 17(3): 274~279
- 简纪常,叶剑敏,吴灶和. 2004. 溶藻弧菌脂多糖对石斑鱼免疫功能的影响. 水生生物学报, 28(1): 103~105
- 柯 岩. 2000. 大肠杆菌脂多糖核芯型及其检测方法. 微生物学免疫学进展, 28(4): 90~94
- 李永芹,简纪常,吴灶和. 2004. 红鳍笛鲷弧菌病原的研究. 湛江海洋大学学报, 24(6): 1~5
- 刘 淇,李海燕,王 群,刘 萍,戴芳钰,李 健. 2007. 梭子蟹育苗病原菌——溶藻弧菌的鉴定及其系统发育分析. 海洋水产研究, 28(4): 9~13
- 陆书华,尚 玮,徐建设,李晓霞,钟启平. 2008. 大肠埃希菌脂多糖脂质的制备及免疫保护实验. 中国病原生物学杂志, 3(5): 338~340
- 庞兴红,周永灿,徐先栋,郭少华,谢珍玉. 2011. 基于一种新基因的溶藻弧菌毒力菌株检测方法的建立. 水产科学, 待刊
- 萨姆布鲁克, J., 拉塞尔, D. W. 2002. 分子克隆实验指南(第 3 版). 北京: 科学出版社, 1 717~1 718, 1 730
- 孙宝剑,裴 品. 2001. 柱状嗜纤维菌的外膜蛋白和脂多糖及其对鳃的免疫原性. 水生生物学报, 25(5): 524~527
- 王加兰,胡 森,郑孝辉,范 蕾,步志高. 2009. 光滑型布鲁氏菌 LPS 单克隆抗体的制备及鉴定. 中国预防兽医学报, 31(8): 642~645
- 徐先栋,谢珍玉,王世锋,周永灿. 2009. 脂多糖快速银染检测方法的建立. 生物技术通报, 3: 95~97
- 尹国才,李 俐. 1993. 四株不同毒力的土拉弗氏菌脂多糖的 SDS-PAGE 图谱的初步观察. 中国人兽共患病杂志, 9(6): 7~8
- 张伟妮,周 丽,邢 婧,战文斌. 2008. 水产动物主要弧菌外膜蛋白结构的比较分析. 海洋水产研究, 29(2): 23~27
- 周永灿,张 本,陈雪芬,钱家英. 2002. 嗜麦芽假单胞菌脂多糖的制备及其在卵形鲳鲹中的免疫效应. 水产学报, 26(2): 143~148
- 朱传华,何建国,黄志坚. 2000. 网箱养殖石斑鱼暴发性溃疡病病原菌分离、鉴定及致病性研究. 中山大学学报(自然科学版), 39(增刊): 278~282
- Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F., and Swings, J. 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. Environ Microbiol. 7(9): 1 488~1 495
- Mausumee, G., and Nigel, M. 2001. LPS induction gene expression in human monocytes. Cell Signal, 13: 85~94
- Schrohm, A. B., Brandenburg, K., Lopnow, H., Moran, A. P., Koch, M. H. J., and Rietschel, E. T. 2000. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the sharp of their lipid A portion. Eur. J. Biochem. 267(7): 2 008~2 013
- Tsai, C., and Frasch, C. E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 119: 115~119
- Westphal, O., and Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods in Carbohydrate Chemistry, 5: 83~96