

溶藻弧菌铁载体合成及外膜蛋白表达的研究

王蓬勃 马悦 刘琴 张元兴*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘要: 初步研究了海洋动物病原菌溶藻弧菌的铁摄取机制。溶藻弧菌能够在高浓度铁螯合剂 2'-2' 二联吡啶的培养基中存活。在限铁环境中, 溶藻弧菌生长受到抑制, 补加铁可以消除这种抑制作用。通过铁载体定量检测, 发现分离于发病鱼体的溶藻弧菌 MVP01 产铁载体量大于分离于海水的菌株 No. 1. 1587。互补实验证明溶藻弧菌的铁载体粗提物能够被铁载体合成缺陷的大肠杆菌突变株 AN93 利用。在铁限制培养环境中, 溶藻弧菌合成了约 80 kD 铁调控外膜蛋白。铁摄取系统在溶藻弧菌的生存和致病性方面, 都有重要的作用。

关键词: 溶藻弧菌, 铁载体, 外膜蛋白

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2006) 02-0048-06

Growth, Siderophore Production and Outer Membrane Protein Expression of *Vibrio alginolyticus* by Iron Regulation

WANG Peng-Bo MA Yue LIU Qin ZHANG Yuan-Xing*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: Iron uptake mechanism of *Vibrio alginolyticus* was primarily investigated. *V. alginolyticus* could survive in the medium with high-concentration iron chelator. The strain of *V. alginolyticus* isolated from diseased fish produced more siderophore than that from marine environment. The extract of siderophore from *V. alginolyticus* could stimulate the growth of *Escherichia coli* mutant AN93. Under iron limitation, the growth rate was decreased and several outer membrane proteins were induced. Adding iron into the iron-limited medium the normal growth could be recovered.

Key words: *Vibrio alginolyticus*, Siderophore, Outer membrane protein

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是海水养殖中主要病原菌之一。能引起鱼、虾、贝等多种水产动物的疾病, 而且对人类也有致病作用, 主要是引起肠道感染, 可通过伤口和食物感染人类^[1,2]。铁是微生物生长必需的营养因素, 但铁却不是容易获取的营养。在动物宿主中, 铁结合蛋白将铁螯合, 形成严格的限铁环境。在体外, 可以用限铁培养基模拟致病菌在动物体内的生长环境^[3]。致病菌在缺铁条件下, 往往表达具有高亲和性的铁摄取系统, 通过两种主要的机制摄铁。第一种是病原菌直接和宿主铁源结合 (通常是转铁蛋白或铁蛋白), 然后经特异的外膜蛋白将铁还原而吸收; 第二种是病原菌合成铁载体夺取宿主铁源^[4]。铁载体是一种分泌的低分子量 (小于 1,000)、并且与铁离子高亲和和特异性结合的物质。

关于溶藻弧菌的铁载体摄取系统没有进行过研究。本文对溶藻弧菌在不同铁营养环境中的生长特性、铁载体产生和铁诱导的外膜蛋白表达进行了初步的考察。

* 通讯作者 Tel: 021-64253065, Fax: 021-64253025, E-mail: yxzhang@ecust.edu.cn

收稿日期: 2005-06-02 修回日期: 2005-08-15

1 材料与方法

1.1 细菌菌株

溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) MVP01 分离自福建宁德患病大黄鱼, 具有强毒力, 由厦门大学苏永全教授惠赠。大肠杆菌铁载体产生缺陷株 *E. coli* AN93 由美国德克萨斯大学 Charles Earhart 博士惠赠。溶藻弧菌 *V. alginolyticus* No. 1. 1587, 分离于海水, 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。

1.2 培养基

富铁培养基: 0.2% 葡萄糖为碳源的 M9 培养基补加氯化铁浓度至 20 $\mu\text{mol/L}$ 。铁限制培养基: 在以 0.2% 葡萄糖为碳源的 M9 培养基中, 补加 2'-2' 二联吡啶终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。混合培养基: 在以 0.2% 葡萄糖为碳源的 M9 培养基中, 补加 2'-2' 二联吡啶浓度至 100 $\mu\text{mol/L}$, 补加氯化铁浓度至 200 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 2'-2' 二联吡啶对溶藻弧菌的最低抑制浓度

2'-2' 二联吡啶在培养基中螯合铁, 形成限铁环境。2'-2' 二联吡啶的最低抑制浓度 (MIC, minimal inhibitory concentration) 用如下方法测定。在补加干酪素的 CM9 液体培养基中 (CM9, 补加酪蛋白水解物的 M9 培养基), 将单个克隆的溶藻弧菌 No. 1. 1587 于 30℃ 摇瓶培养至 10^8 cells/mL。然后将培养物用补加不同浓度 2'-2' 二联吡啶的新鲜 CM9 培养基稀释至 10^3 cells/mL, 将其涂布于相同抑制浓度的 CM9 固体培养基。培养 24 h 计数, 没有细菌生长的最低 2'-2' 二联吡啶浓度作为最低抑制浓度。

1.4 溶藻弧菌的生长和铁载体的产生

考察溶藻弧菌 No. 1. 1587 在铁丰富培养基、铁限制培养基和混合培养基中 3 种不同条件的生长。挑取单菌落于 M9 培养基生长做种子, 接种 1% 至 3 种不同培养基。每隔 3 h 取样, 600 nm 测 OD 值, 检测菌体生长状况。

考察溶藻弧菌产铁载体的界限浓度, 采用 8-羟基喹啉除铁的 MM9 培养基 (MM9, 将 M9 培养基磷酸二氢钾减少到 1/10, 缓冲体系换为 50mmol/L Tris-HCl)。在添加不同浓度铁离子的条件下检测铁载体。采用一种 CAS (Chrome azurol S, 铬天青 S) 液体法检测铁载体^[5]。铁载体能夺取 CAS 复合物中的铁离子, 测量反应液 630nm 的 OD 值。

1.5 互补实验

溶藻弧菌 No. 1. 1587 在 Chelex-100 除铁的 M9 培养基培养 24 h。12,000 g 离心, 调上清 pH 至 7.0, 用 1/2 体积氯仿-苯酚 (1:1, w/w) 萃取。有机相用等体积乙醚萃取, 然后用去离子水萃取^[6]。得到粗提物, 大肠杆菌 AN93 做指示菌株, 在铁限制培养基中考察铁载体对其生长的促进作用。

1.6 不同来源的溶藻弧菌产铁载体能力

挑取单菌落接种在 CAS 固体培养基上。以铁载体圈和菌落直径的比值定性比较 MVP01 和 No. 1. 1587 产铁载体的能力, 采用 CAS 溶液法定量比较两者。柠檬酸可以和 CAS 试剂反应, 所以用柠檬酸的浓度来表征两种菌产铁载体的能力。

1.7 铁诱导外膜蛋白的提取

在铁限制和铁丰富培养基中培养 20 h。菌体收集于 1.5 mL Tris-HCl-0.3% NaCl (pH 8.0) 的缓冲液中。冰浴, 超声破碎菌体。使用十二烷基肌氨酸钠方法分离细菌外膜蛋白^[7]。

2 结果与讨论

2.1 2'-2' 二联吡啶对溶藻弧菌的最低抑制浓度

溶藻弧菌 No. 1. 1587 在 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 1.2, 1.5, 2 L, 3 mmol/L 的 2'-2' 二联吡啶梯度浓度下测定 MIC。在 0.8 mmol/L 浓度下, 没有溶藻弧菌菌落形成。0.8 mmol/L 是溶藻弧菌对 2'-2' 二联吡啶的最低抑制浓度。

溶藻弧菌能够在高铁螯合剂浓度的环境中生存, 说明它具有一套高效的铁摄取系统, 能够将铁离子从螯合剂中夺取, 也说明它对宿主体内的限铁环境有抗性。

2.2 溶藻弧菌的生长及铁载体的产生

比较溶藻弧菌 No. 1. 1587 在铁丰富培养基、铁限制培养基和混合培养基 3 种培养基中的生长特性 (图 1)。

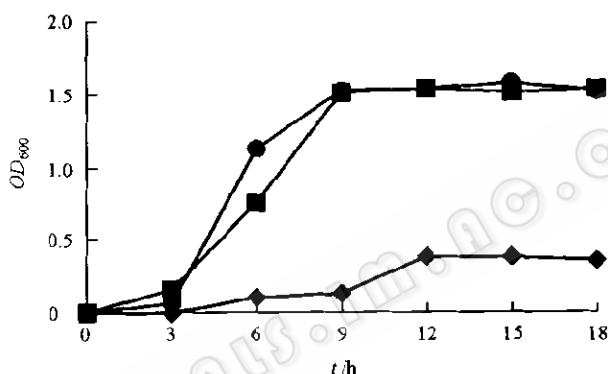


图 1 溶藻弧菌在不同铁营养中的生长

● 铁丰富培养基, ■ 混合培养基, ◆ 铁限制培养基

铁螯合剂对于溶藻弧菌的生长有抑制作用。但是这种抑制作用并不是由于铁螯合剂本身的毒性引起, 溶藻弧菌可以在 0.8 mmol/L 的高浓度铁螯合剂环境中生存, 而且在铁限制的培养基中补加铁营养完全可以抵制这种抑制作用。这个现象说明在溶藻弧菌的生长中, 铁营养扮演了重要的角色。

考察溶藻弧菌在不同铁离子浓度环境中, 产铁载体的情况 (图 2)。因为 M9 培养基中磷酸盐含量过高, 对于 CAS 法定量检测铁载体有干扰, 实验采用 MM9 培养基。培

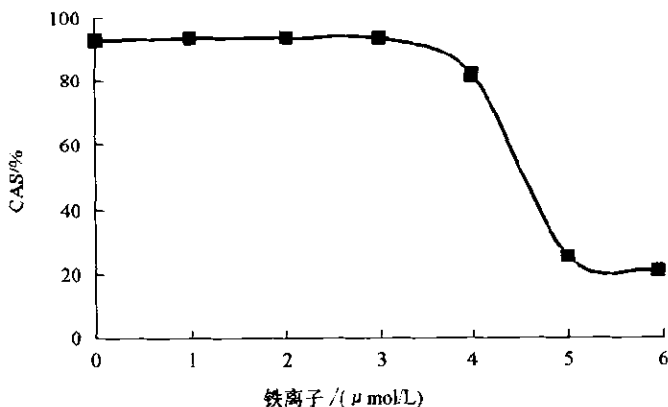


图 2 铁离子对溶藻弧菌铁载体产生的影响

养上清与 CAS 试剂反应后,有铁载体的情况下,由于颜色变化 630 nm 光密度变小,所以铁载体的量通过 CAS 比值来表示。CAS 比值:(对照 - 测量)/对照。对溶藻弧菌生长而言,铁载体的产生受到铁离子浓度的严格调节。在环境中铁离子浓度大于 4 $\mu\text{mol/L}$ 后,铁载体的量明显降低。4 $\mu\text{mol/L}$ 铁离子是溶藻弧菌产铁载体的界限浓度。当环境中铁离子浓度较高,可以通过非特异系统摄取铁营养,只有在铁营养不足时,细菌才合成铁载体来摄取铁。

通过 CAS 化学方法,证明溶藻弧菌能产生铁载体,且产生受到铁离子严格调节。由于溶藻弧菌培养上清对检测铁载体经典类型的 Arnow Test 和 Csaky Test 都呈阴性反应^[8],怀疑溶藻弧菌的铁载体并不属于已经发现的经典类型的一个分支,而是一种未知结构。

2.3 交叉互补实验

大肠杆菌 AN93 是铁载体合成缺陷株,在限铁环境中的生长较差,但是它的铁载体传输系统正常。且大肠杆菌有多种铁载体传递系统,可以摄取不同类型的铁载体。

补加具有铁载体活性的物质后,促进 AN93 在限铁环境生长。因此可以用 AN93 作为指示菌株对未知铁载体进行生物活性检测。本实验发现藻弧菌铁载体粗提物,可以明显促进 AN93 生长(图 3)。从生物活性角度初步证明了溶藻弧菌在限铁环境中产生具有铁载体功能的物质。

2.4 不同来源的溶藻弧菌产铁载体能力

挑取溶藻弧菌 MVP01 和 No. 1. 1587 单菌落接种于 CAS 指示平板,生长至菌落不再增大。用铁载体圈直径/菌落直径的比值表征铁载体产量。计算 MVP01 和 No. 1. 1587 铁载体圈和菌落的直径比值分别是 3.3 和 2.0 (图 4)。比值不同说明产铁载体能力不同。在溶藻弧菌生长过程中,取不同时间培养上清用 CAS 液体法检测铁载体量。为了得到两种溶藻弧菌铁载体绝对含量的比较,用柠檬酸作为参照来表征铁载体的量。MVP01 产铁载体的量超过 No. 1. 1587,对应柠檬酸浓度为 4mmol/L 和 3mmol/L (图 5)。

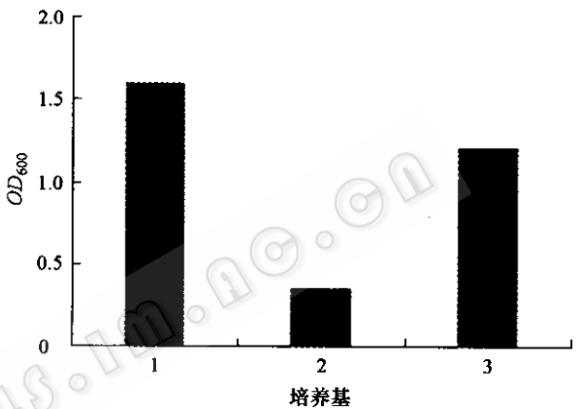


图 3 溶藻弧菌铁载体对大肠杆菌 AN93 生长促进作用

1 铁丰富培养基, 2 铁限制培养基,
3 铁限制培养基补加氯仿苯酚萃取物

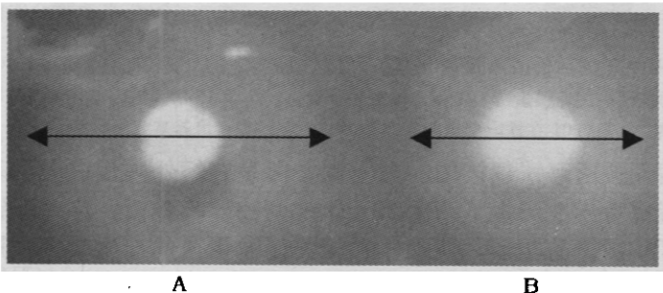


图 4 溶藻弧菌在 CAS 平板上的生长

A MVP01, B No. 1. 1587 (箭头表示直径大小)

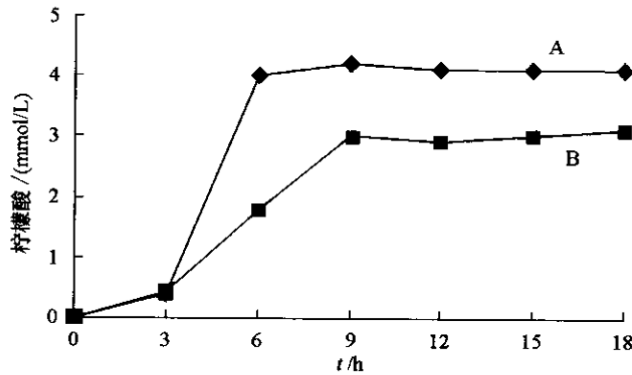


图5 以柠檬酸表征溶藻弧菌铁载体的产量
A MVP01, B No. 1.1587

两种测试方法都充分说明了 MVP01 产铁载体能力较强。MVP01 是分离于发病鱼体, No. 1.1587 来源于海水。溶藻弧菌是一种海水养殖动物病原菌, 在宿主体内限铁环境的定殖能力直接关系到其致病性, 本实验发现溶藻弧菌能够在严格限铁环境中生存, 并且在低铁环境中产生了铁载体, 而且不同来源的溶藻弧菌产铁载体能力有较大差异。预示着溶藻弧菌的摄铁系统可能与致病性密切相关。为研究溶藻弧菌的致病机制提供了一个切入角度。

2.5 铁诱导外膜蛋白

制备两种溶藻弧菌在铁丰富培养基和铁限制培养基中的外膜蛋白。SDS-PAGE 分析结果如图 6, 在限铁环境中, 溶藻弧菌可以表达出更多的外膜蛋白, 这些外膜蛋白的表达和铁营养是否充分密切相关。

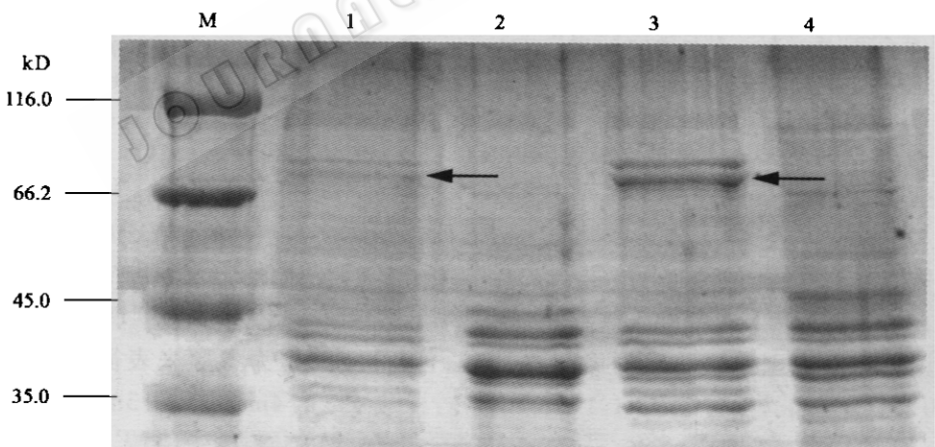


图6 两种方法制备溶藻弧菌在富铁和限铁环境下的外膜蛋白的 SDS-PAGE 结果
(箭头指向为铁调控的外膜蛋白) M 蛋白标准分子量, 1 No. 1.1587 在铁限制培养基, 2 No. 1.1587 在富铁培养基, 3 MVP01 在铁限制培养基, 4 MVP01 在铁丰富培养基

虽然两种溶藻弧菌产铁载体的能力不同, 但是它们外膜蛋白图谱基本一致。且在限铁环境中两者都特异性产生了约为 80 kD 铁调控外膜蛋白, 这些限铁环境诱导的蛋白很可能参与了铁载体的转运。铁载体和相关传输蛋白的产生受到铁严格调控, 有以下原因。(1) 铁载体的传输需要能量, 在铁营养充足的情况下, 利用铁载体是一种能量浪费。(2) 传输铁载体的外膜蛋白往往是噬菌体结合的靶点, 防止噬菌体感染, 细菌不能恒定表达这些蛋白。所以, 必须严格控制铁载体和传输外膜蛋白的合成。

铁调控外膜蛋白在病原菌侵染和定殖过程中起到关键作用, 往往与致病性密切相关^[3]。因此对这些铁调控外膜蛋白作为免疫保护性抗原及其致病性方面的研究已经引起国内外学者的广泛兴趣。

参考文献

- [1] 吴后波, 潘金培. 中国水产科学, 2001, 8: 89 ~ 93.
- [2] 林业杰, 欧剑鸣, 董新平. 海峡预防医学杂志, 2001, 7: 45 ~ 46.
- [3] Colin R, Lynn G D. Ann Rev Microbiol, 2000, 54: 881 ~ 941.
- [4] Andrews S C, Robinson A K, Rodríguez-Quiriones F. FEMS Microbiol Rev, 2000, 27: 215 ~ 237.
- [5] Bernhard S, Neilands J B. Anal Biochem, 1987, 160: 47 ~ 56.
- [6] Linda M S, James D O. Infect Immun, 1983, 41: 644 ~ 649.
- [7] Crosa J H, Hodges L L. Infect Immun, 1981, 31: 223 ~ 227.
- [8] Neilands J B. J Biol Chem, 1995, 270: 26723 ~ 26726.