

迟缓爱德华菌的外膜蛋白图谱及耐药性分析*

黄新新¹ 陆承平²

(南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘 要:分析 27 株不同来源的迟缓爱德华菌(Et)的外膜蛋白(OMP),可分为 A~H 8 个型。21 株致病株与 6 株非致病株有明显不同的图谱。致病株 OMP 条带多而深浓,并且相同来源的菌株有几乎一致的图谱。其中国内致病株以 E 型为主,与 ATCC 参考株相似。非致病株 OMP 条带则浅而稀疏,来源虽不同,但图谱极类似。另外,6 株非致病株对磺胺、庆大、四环素等抗生素普遍耐药,而致病株除少数几株外,均对抗生素有不同程度的敏感。

关键词:迟缓爱德华菌,外膜蛋白,图谱,耐药性

中图分类号:S947.12 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 05-0630-05

外膜是革兰氏阴性菌的特殊结构,一方面可作为一道天然屏障阻碍药物等进入细胞。另一方面,包括微孔蛋白在内的外膜蛋白(OMP)却对小分子亲水性的营养物质和抗生素有良好的通透性^[1],因而与细菌和致病性及耐药性有关。迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*, Et)是人和动物的致病菌,在我国各地尤其是特种水产动物的养殖基地均有发现。本试验采集不同来源的 27 株,作 SDS-PAGE 分析其 OMP,并探讨了 OMP 图谱的分型及其与耐药性的关系。

1 材料和方法

1.1 Et 菌种

27 株 Et 中,19 株国内分离,8 株国外引进,包括 ATCC15947 = DSM30052,由德国吉森大学 Baljer 教授惠赠,其余分别由德国中黑森州兽医站 Nilz 博士、美国加州卫生部微生物实验室 Janda 教授、日本宫崎大学 Aoki 教授惠赠。江苏海安鳗发离株由王广和提供。27 株中 M8、203、D6、22、751、753 根据葛艳的实验指标判定为非致病株^[2,3],其余均为致病株。参见表 2。

1.2 OMP 的提取

参照 Dilip^[4]的方法略有改动。低速离心细菌培养物,收集菌体,用 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.4,含 10 mmol/L EDTA)缓冲液洗涤 3 次,置冰浴中超声波破碎细胞 10 min;以 5000 g 4 ℃离心 30 min,收集上清液;经 50000 g 离心 1 h,弃上清。沉淀溶于 0.5% (w/v)十二烷基肌酸钠(Sackosyal)的上述缓冲液中,置 37 ℃作用 30 min,以 50000 g 离心 1 h,弃上清;然

* 江苏省“九五”重点攻关项目(BE96427)

¹现工作单位:东南大学医学院微生物组,210009

²通讯作者

作者简介:黄新新(1974-),女,江苏省海门人,硕士。

收稿日期:2000-11-20,修回日期:2001-03-26

后用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗沉淀 1~2 次,溶于双蒸水(DDW),置 -20 ℃ 保存。蛋白质浓度用紫外分光光度计测定。

1.3 SDS-PAGE

参照文献[5]略加修改。将提取的 OMP 用 SDS-PAGE 垂直板电泳检测。梯度胶浓度为 7.5%~15.0%,加样量为 15~20 μg/孔,泳毕固定,考马斯亮兰 R250 染色过夜,脱色。

1.4 药敏试验

采用纸片扩散法,购自上海市卫生防疫站,所用的抗生素有:氯霉素(Cm)、磺胺(Smx)、庆大霉素(Gem)、四环素(Tet)、呋喃唑酮(Ft),结果判定参照标准^[6]。

2 结果

2.1 OMP 图谱

27 株 Et 经 SDS-PAGE 电泳分析 OMP,21 株致病株与 6 株非致病株 OMP 图谱明显不同。致病株 OMP 条带多而深浓,主条带集中于 30.0 kD~45.0 kD 之间。非致病株条带则相对稀疏、细浅,主条带分别为 37.8 kD、46.8 kD、55.0 kD。另外,来源相同的致病株,OMP 图谱基本相似。例如来自美国的 ET-1、ET-11;ET-12、ET-13,来自福建的 121、123,来自日本的 SA8318、AC8321 以及来自江苏海安的 43、44、45、51、66、73、78、105。各自有其相似的图谱。6 株非致病株虽来源不尽相同,但图谱却也极其相似(图 1)。

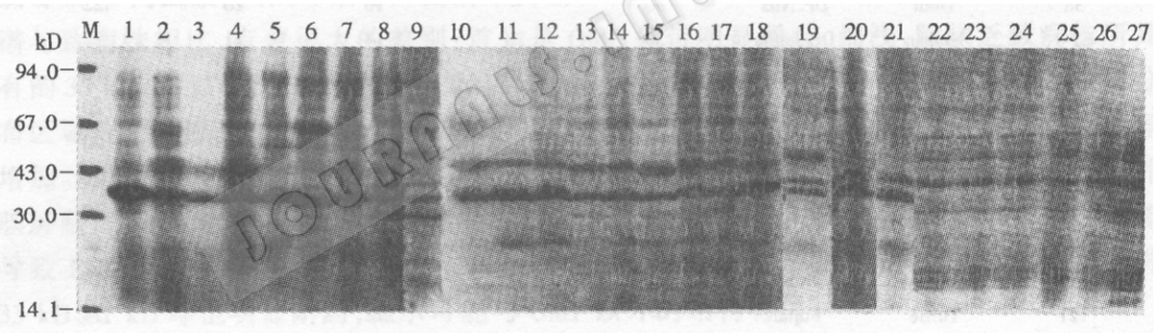


图 1 Et OMP SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE analysis of OMP from Et

1~27. ET-1, ET-11, ET-12, ET-13, 121 122, 123, SA8318, AC8321, 43, 44, 45, 51, 66, 73, 78, 105, 15947, 38, JF, JEL4, M8, 203, D6, 22, 751, 753;
M. Molecular weight markers.

2.2 OMP 图谱分型

根据 OMP 变化特征,将 Et 分为 A~H 8 个型,其中致病株以 E 型为主,非致病株为 H 型,见表 1。

2.3 药敏试验

致病株与非致病株对抗生素的敏感性差异较大。OMP 条带丰富的致病株除 121、122、123 有相当程度的耐药性,其余 18 株均对抗生素较敏感,出现不同程度的抑菌圈。非致病株对磺胺、庆大、四环素耐药,对氯霉素、呋喃唑酮等抗生素的敏感性也普遍不如致病株,见表 2。

表 1 Et 的 OMP 分型

Table 1 Electrophoresis types of Et

Type	Major bands/kD	Strains
A	35	ET-1 ET-11
B	33 35	ET-12 ET-13 121 123
C	31 36	122
D	28 33 38 48	AC8321 SA8318
E	35 45	15947 43 44 45 51 66 73 78 105
F	33 38 47	38
G	33 38	JEL4 JF
H	37.8 46.8 55	M8 203 D6 22 751 753

表 2 27 株 Et OMP 药敏检测结果

Table 2 The results of antibiotic susceptibility of Et strains

Strain	Host	Source	Direction of bacterial resistance circle/mm				
			Cm	Smx	Gem	Tet	Ft
15947	Human	ATCC	26	34	15	26	26
38	Trout	Dr. Nilz	30	—	16	20	22
ET-1	Human	Dr. Janda	30	28	14	21	22
ET-11	Human	Dr. Janda	26	18	10	14	16
ET-12	Human	Dr. Janda	28	20	12	20	20
ET-13	Human	Dr. Janda	30	—	16	24	20
SA8318	Floude	Dr. Aoki	30	18	16	20	26
AC8321	Eel	Dr. Aoki	34	8	16	24	20
JEL4	Fel	Guangdong	20	—	12	22	24
JF	Unknown	Hubei	24	18	16	26	24
121	Turtle	Fujian	—	—	12	—	14
122	Turtle	Fujian	—	—	—	—	14
123	Turtle	Fujian	8	—	12	—	15
M8	Eel	Guangdong	20	—	12	12	14
203	Eel	Hubei	16	—	—	—	20
D6	Eel	Guangdong	16	—	16	—	20
22	Eel	Guangdong	16	—	—	8	16
751	Eel	Jiangsu	18	—	—	—	14
753	Turtle	Fujian	18	—	—	—	14
43	Eel	Jiangsu	NT	NT	12	20	15
44	Eel	Jiangsu	NT	NT	13	19	15
45	Eel	Jiangsu	—	—	18	24	18
51	Eel	Jiangsu	NT	NT	13	22	18
66	Eel	Jiangsu	NT	NT	13	20	17
73	Eel	Jiangsu	26	14	8	24	18
78	Eel	Jiangsu	14	24	26	28	28
105	Eel	Jiangsu	NT	NT	15	20	17

NT: not tested

3 讨论

Et 对多种动物和人致病,是一种重要的人畜共患病病原。近年来随着特种水产养殖在我国广泛兴起,该菌的危害也日益突出,引起国内外普遍关注^[2,7]。Et 的鞭毛、溶血素、胞外产物等致病因子都已有了较为深入的分析^[2,8],而对 OMP 则缺乏系统的研究,本试验试图填补这空白。

OMP 是细菌基因的表达产物,因而 OMP 可作为基因及流行病学研究中有价值的标记^[9]。Murphy^[10]等利用 OMP 的差异,将 48 株不含荚膜的流感嗜血杆菌分成 8 个亚型。朱勇^[11]等分析了 87 株不同来源霍乱弧菌,根据图谱特征将其分成 7 个型。至于对 Et 的 OMP 如何分型,国内外尚未见报道。本试验根据 SDS-PAGE 图谱特征,将 27 株 Et 分为 8 个型。其中国内致病株以 E 型为主,与 ATCC 参考株相似,非致病株则为 G 型。一般而言,对细菌进行 OMP 分型需较多菌株,但 Et 分离株的数量较少,一般多用 20 余株。如 Janda 检测 Et 能否产生肠毒素用 25 株^[7],Ullah^[12]检测 Et 侵袭性时仅用 19 株。本试验用于分型的 Et 尽管只有 27 株,对 Et 而言,仍能说明问题。

OMP 尤其是主要 OMP(MOMP)中的微孔蛋白(porin,分子量为 30 kD ~ 45 kD)在介导营养物质运输、亲水性抗生素渗透等方面发挥重要作用。近年来陆续报道,因微孔蛋白含量减少或丢失而使细菌对抗生素产生了耐药性^[13,14]。特别是微孔蛋白含量减少或丢失与氯霉素、 β -内酰胺类、四环素等产生的耐药密切相关。本试验选取的 6 株非致病株 OMP 图谱与致病株相比,有着很大的差别:首先是 OMP 条带明显稀疏、细浅,除缺乏致病株所具有的 33 kD、35 kD、45 kD 等主条带外(其中 35 kD 为 Et 的微孔蛋白),它所具有的主条带分布区域分子量偏高,此外,它们对氯霉素、庆大霉素、四环素及其他抗生素的耐药性均明显增加。由于 OMP 是细菌内部与外界沟通的渠道,条带的缺失、减少会使细菌形成一种外膜屏蔽,既不利于营养物质、抗生素等的输入,也不利于毒性产物的分泌与运输,因而可能导致 Et 毒力及耐药性改变。当然,细菌的耐药机制很复杂,例如 121、122、123 虽含主条带 33 kD、31 kD 却也明显耐药,提示可能与 OMP 以外的结构有关。

参 考 文 献

- [1] 张小林. 临床荟萃, 1996, 11: 392 ~ 394.
- [2] 葛 艳, 陈怀青, 陆承平. 中国兽医学报, 2000, 20(1): 34 ~ 37.
- [3] 葛 艳, 陈怀青, 陆承平. 中国预防兽医学报, 1999, 21(1): 4 ~ 6.
- [4] Dilip K S, Tapask, Asoke C G. *Infect Immun*, 1992, 60(11): 4848 ~ 4855.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T (金冬雁译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996. 880 ~ 885.
- [6] 李影林主编. 临床微生物学及检验. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 78 ~ 79.
- [7] Janda J M, Abbott S L, Kroske-Bystrom S, et al. *J Clin Microbiol*, 1991, 29: 1997 ~ 2001.
- [8] 欧阳志明, 陈怀青, 陆承平. 南京农业大学学报, 1997, 20(30): 87 ~ 91.
- [9] 胡龙飞, 陈志新. 国外医学流行病学传染病学分册, 1991, 18: 212 ~ 216.
- [10] Murphy T F, Dudask C, Mylotte J M, et al. *J Infect Dis*, 1983, 147(5): 838 ~ 846.
- [11] 朱 勇, 刘延清. 中华流行病学杂志, 1993, 14(特刊 45 号): 183 ~ 187.
- [12] Ullah M A, Arai T. *Fish Pathol*, 1983, 18: 65 ~ 70.

[13] Nikaido H. *Mol Microbiol*, 1992, 6:435 ~ 442.

[14] Nikaido H. *Science*, 1994, 264:382 ~ 388.

ANALYS OF OUTER MEMBRANE PROTEIN AND DRUG-RESISTANT OF *EDWARDSIELLA TARDA*

Huang Xinxin Lu Chengping*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The SDS-PAGE profiles of out membrane protein(OMP) of 27 Et strains showed diverse patterns and they could be divided into six types. Between 21 pathogenic strains and 6 non-pathogenic strains there were obviously difference. The pathogenic strains isolated from China belong to E type and were simary to ATCC 15947. The OMP bands of pathogenic strains were more and denser than those of the non-pathogenic strains, and the strains from same souce had the identical patters. Interestingly, the non-pathogenic strains from different sources also had the almost same OMP profiles. What's more, they were also high resistant to some antibiotics such as Smx, Gem Tet and so on, while the 18 pathogenic strains were sensivity to these.

Key words: *Edwardsiella tarda*, Outer membrane protein, Patterns, Drug-resistant

* Corresponding author