

利用超氧化物歧化酶免疫学研究确定东方弧菌 和一些海洋细菌的关系

杨颐康 朱文杰 吴自荣

(华东师范大学生物学系, 上海)

Linda Baumann Paul Baumann

(Department of Bacteriology, University of California, Davis, U.S.A.)

本文报道了应用超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 的免疫学研究(微量补体结合和凝胶双向扩散技术)确定东方弧菌 (*Vibrio orientalis*) 和其他一些海洋细菌间的关系的结果。以从 *V. alginolyticus* 90, *V. splendidus* biotype II 2, *V. fischeri* 61, *V. cholerae* M13 中提取的 SOD 作为抗原制成的血清, 和东方弧菌 715、716、717 菌株的 SOD 进行反应, 测得免疫距离分别为 6.4 ± 0.1 、 23.5 ± 0.2 、 26.0 ± 0.8 和 59.2 ± 0.4 ImD。这一结果表明, 东方弧菌虽属于弧菌属, 但不同于弧菌属的其他种。三度空间的模型说明东方弧菌和许多海洋细菌有关, 其中包括常见的 *V. harveyi*、*V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus*、*V. pelagius*、*V. nereis*、*V. campbellii*。最接近的海洋弧菌为菌株 77。

关键词 超氧化物歧化酶; 弧菌属; 海洋细菌; 免疫学

近廿多年来, 在细菌分类学的研究方面进展很大, 引用了许多新的方法, 其中凝胶双向扩散技术^[1]和微量补体结合技术^[2]都是免疫学方法。它不仅可用于分类鉴定, 确定各种细菌在进化上的关系, 测定一个菌种突变程度的大小^[3], 还可以把菌种或菌株之间的差异提高到定量水平。

通常所用的 DNA/DNA 的体外杂交技术, 可以确定两个菌株整个基因组的相似程度。但由于它有高度的专一性, 所以只应用在分析种内菌株之间, 或亲缘关系相近的种间关系^[4,5]。为了测定关系较远的种, 必须直接或间接比较分子量较小而保守性更高的基因组部分, 如进行 rRNA/DNA 的杂交, 或应用微量补体结合技术来比较同类蛋白质的氨基酸顺序的差异^[6]。

1974 年 Champion 等人^[2]首次全面介绍了微量补体结合技术, 随后 Baumann、Woolkalis、Puget 等人^[7-11]也用以研究细菌

分类。通过比较各菌种的碱性磷酸化酶 (AP)、谷氨酰胺合成酶 (GS) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 等的氨基酸序列的差异, 来确定各菌种之间的亲缘关系。

我们从东海、黄海沿岸分离得到 62 株发光细菌, 根据表型特征和数值分析的结果, 分为五个类群, 鉴定为明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*)、鳕鱼发光杆菌 (*P. leiognathi*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、美丽弧菌生物型 I (*V. splendidus* biotype I) 以及一个新种东方弧菌 (*V. orientalis*)^[12,13]。我们从上述 5 种菌和其它 18 种海洋细菌以及一种陆生细菌的代表菌中, 提取了 SOD 作抗原, 选用溶藻酸弧菌 (*V. alginolyticus* 90)、美丽弧菌生物型 II (*V. splendidus* II 2)、费氏弧菌 (*V. fischeri* 61)、霍乱弧菌 (*V. cholerae* M13) 和鳕鱼

本文于 1984 年 3 月 7 日收到。

发光杆菌 (*P. leiognathi* 480) 中提纯的 SOD 制成抗体, 进行凝胶双向扩散实验和微量补体结合实验, 以确定东方弧菌与其它一些海洋细菌之间的关系。

材料和方法

(一) 抗原 SOD 的提取

细菌接种于发光培养基中^[7], 20℃ 下振荡培养 12 小时, 3,000rpm 离心 10 分钟, 然后用超声波破坏细菌胞壁, 用 1% 链霉素硫酸盐沉淀核酸, 再分别用 50% 和 80% 饱和硫酸铵沉淀蛋白质。第二次的沉淀物用 5mM K_2HPO_4 (pH7.8) 缓冲液溶解, 在同样浓度的缓冲液中透析。在测得 SOD 的活性单位后^[7], 分别装瓶, 储存于 -80℃ 的冰箱中。本实验共用 27 种抗原, 其中包括 *V. orientalis* 715、716、717、718; *P. leiognathi* 691; *P. phosphoreum* 659; *V. harveyi* 703; *V. splendidus* 1714 等的 SOD。

(二) 抗血清的制备

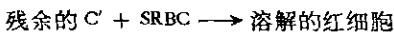
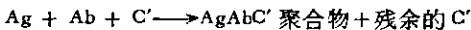
1. 从 *V. alginolyticus* 90、*V. splendidus* 112、*V. cholerae* M13、*V. fischeri* 61、*P. leiognathi* 480 中提取 SOD, 根据 Puget 和 Michelsen^[14] 的方法进行纯化。

2. 分别给三只雄性新西兰白兔注射纯 SOD, 每只注射 5 次, 每次 1mg。抗体形成后, 制成抗血清。

各抗血清和同源抗原反应时, 补体结合为 75% 时所得的滴度和通过该点直线的斜率列入表 1。

(三) 微量补体结合实验

定量的微量补体结合实验按 Champion 等的方法进行。反应过程如下:



同源和异源抗原都使用四个浓度, 二倍法稀释, 分别与 3—6 个浓度的抗血清反应, 使 30—80% 的补体在反应平衡时结合。反应在 0℃ 下进行。反应完全后, 各反应管中加敏感绵羊红细胞, 在 35℃ 下反应。然后用比色法测定各管血红素的浓度。计算各管补体结合的百分数。免疫距离 ImD 和斜率 M 按 Champion^[7] 等人的公式计

表 1 用于实验的抗血清的滴度和平均斜率

Table 1 Summary of the titers of reference anti-serum and average slope values in experiments

参考菌株 Reference strain	滴 定 度 Titer	斜率±标准误差 Slope±SD
<i>V. alginolyticus</i> 90	1/13,000	254±64
<i>V. splendidus</i> 112	1/37,000	276±55
<i>V. fischeri</i> 61	1/14,000	288±53
<i>V. cholerae</i> M13	1/25,000	286±52
<i>P. leiognathi</i> 480	1/8,400	261±52

算:

$$\text{ImD} = 100 \times \log (\text{异源血清滴度} / \text{同源血清滴度})$$

$$M = \frac{\text{补体结合的百分数}}{\log \text{抗血清浓度}}$$

1 ImD^[7] 相当于蛋白质分子上 0.2% 的氨基酸序列的变化。

(四) 凝胶双向扩散实验

凝胶平板成份为: 10mM K_2HPO_4 (pH7.8), 1% 琼脂, 0.58% NaCl 和 0.02% Ethylmercurithiosalicylate。平板上的洞距 4mm。每个洞内注入 20μl 的抗原或抗血清。抗原抗血清反应后, 两个邻近的抗原和抗血清之间的沉淀线完全融合者, 标为“=”, 说明两个抗原的决定因子是一致的或明显一致; 如一抗原的沉淀线有距而邻近的另一抗原没有距, 则说明前者的抗原决定因子多于后者, 标为“↑”, 箭头指向有距的一个抗原; 结果沉淀线形成双距, 标为“×”, 说明两个抗原部分不一致或完全不同。

结 果

(一) 微量补体结合实验

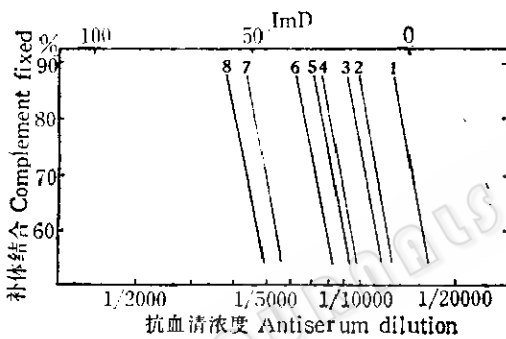
结果列入表 2 和图 1—4。以东方弧菌菌株 715、716、717 的 SOD 为抗原与抗 *V. alginolyticus*、抗 *V. splendidus*、抗 *V. fischeri* 和抗 *V. cholerae* 血清进行反应, 平均结果

Ag = 抗原, Ab = 抗体, C' = 补体, SRBC = 敏感绵羊红细胞, ImD = 免疫距离, M = 斜率。

表 2 东方弧菌菌株 715、716、717 的微量补体结合实验结果 (数据用 ImD 值表示)

Table 2 Results of the microcomplement fixation studies of *V. orientalis* 715, 716, 717 expressed as ImD units

抗血清 Antiserum to the SOD of	菌 株 Strain			平均数和标准差 Average and standard deviation
	715	716	717	
<i>V. alginolyticus</i>	6.4	6.4	6.5	6.4±0.1
<i>V. splendidus</i>	23.4	23.8	23.4	23.5±0.2
<i>V. fischeri</i>	27.3	23.6	26.7	26.0±0.8
<i>V. cholerae</i>	59.0	59.6	59.0	59.2±0.4

图 1 用抗 *V. fischeri* 血清与各种抗原反应, 在反应平衡时补体结合的百分数与抗血清浓度作图Fig. 1 Relation of % complement fixed at equivalence to the log of the antiserum dilution. Experiments were performed with antiserum to the SOD from *V. fischeri*

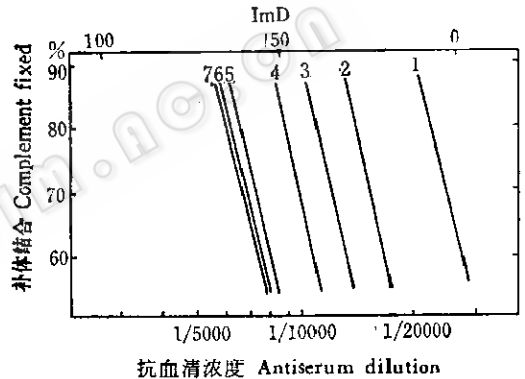
1. *V. fischeri* 61
2. *V. splendidus* II 2
3. *V. alginolyticus* 90
4. Strain 77
5. *V. orientalis*
6. *V. flavialis* I 606
7. *V. cholerae* M13
8. *V. gazogenes*

(以 ImD 表示) 分别为 6.4 ± 0.1 、 23.5 ± 0.2 、 26.0 ± 0.8 、 59.2 ± 0.4 。

根据东方弧菌和各菌种之间的免疫距离, 绘制出一个三度空间模型图 (见图 5) 来表示东方弧菌和其他一些海洋细菌之间的亲缘关系。

(二) 凝胶双向扩散实验

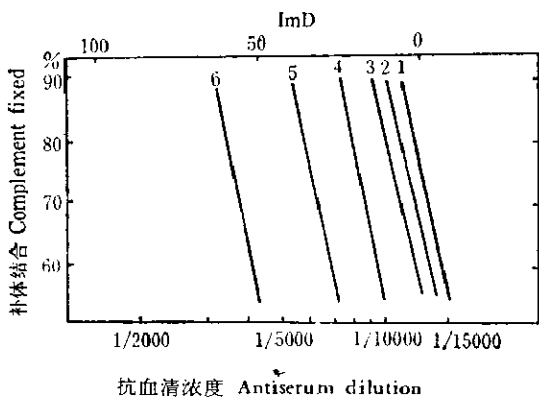
用抗 *V. splendidus*、抗 *V. alginolyticus*、

图 2 用抗 *V. cholerae* M13 血清与各种抗原反应, 在反应平衡时的补体结合百分数与血清浓度作图Fig. 2 Relation of % complement fixed at equivalence to the log of the antiserum dilution. Experiments were performed with antiserum to the SOD from *V. cholerae* M13

1. *V. cholerae* M13
2. *V. metschnikovii*
3. *V. splendidus* II 2
4. *V. alginolyticus* 90
5. *V. logei* 586
6. *V. orientalis*
7. Strain 77

抗 *P. leiognathi* 血清与 25 株海洋细菌和陆生细菌中提取的 SOD 进行反应, 结果列入图 6—8。

从东海、黄海沿岸分离得到的东方弧菌菌株 715 和 718、哈维氏弧菌菌株 703、美丽弧菌生物型 I 菌株 714 可划归弧菌属, 而鳗鱼发光杆菌菌株 691、明亮发光杆菌菌株 659 则可划归发光杆菌属。

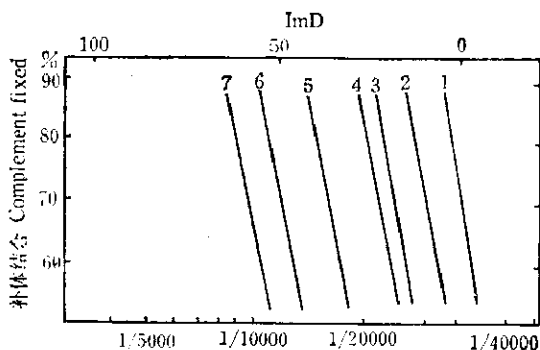


抗血清浓度 Antiserum dilution

图 3 用抗 *V. alginolyticus* 血清与各种抗原反应, 在反应平衡时补体结合的百分数与抗血清浓度作图

Fig. 3 Relation of % complement fixed at equivalence to the log of the antiserum dilution. Experiments were performed with antiserum to the SOD from *V. alginolyticus* 90

1. *V. alginolyticus* 90
2. *V. orientalis*
3. Strain 77
4. *V. fluvialis* 1 606
5. *V. splendidus* 12
6. *V. cholerae* M13



抗血清浓度 Antiserum dilution

图 4 用抗 *V. splendidus* 血清与各种抗原反应, 在反应平衡时补体结合的百分数与抗血清浓度作图

Fig. 4 Relation of % complement fixed at equivalence to the log of the antiserum dilution. Experiments were performed with antiserum to the SOD from *V. splendidus*

1. *V. splendidus* 112
2. *V. fisheri* 61
3. Strain 77
4. *V. orientalis*
5. *V. nigrifulviflora* 164
6. *V. cholerae* M13
7. *V. gazogenes*

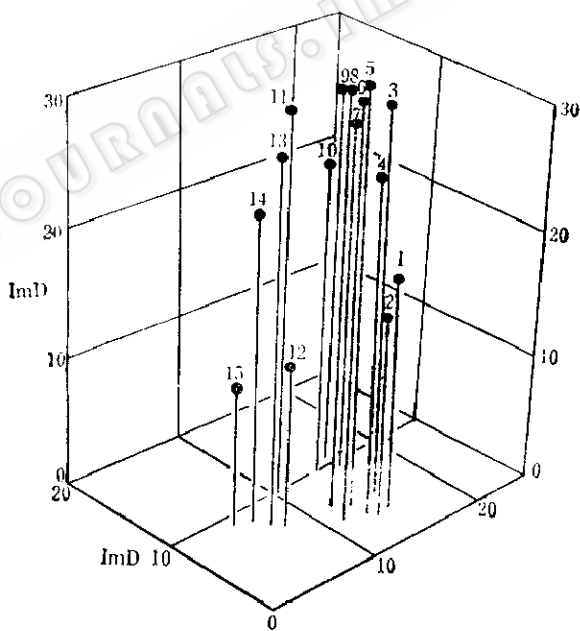


图 5 三度空间模型表示东方弧菌与弧菌属其他菌种之间的免疫距离

Fig. 5 Schematic three dimensional representation of the immunological distances of SODs from *V. orientalis* and closely related species and strains of *Vibrio*

1. *V. fluvialis* I
2. *V. fluvialis* II
3. Strain 84, 85
4. *V. proteolyticus*
5. *V. parahaemolyticus*
6. *V. alginolyticus*
7. *V. natriegens*
8. *V. harveyi*
9. *V. campbellii*
10. *V. nereis*
11. Strain 76, 142, 143
12. *V. pelagius* I
13. *V. orientalis*
14. Strain 77
15. *V. pelagius* II

讨 论

用抗 *V. alginolyticus*、抗 *V. splendidus*、抗 *V. fischeri*、抗 *V. cholerae* 四种血清与东方弧菌 715、716、717 菌株的 SOD 反应，以确定相互间的免疫距离。三株菌的 ImD 平均值分别为 6.4 ± 0.1 、 23.5 ± 0.2 、 26.0 ± 0.8 、 59.2 ± 0.4 。和以往的弧菌属各种的免疫学研究的结果相比较，可以确定东方弧菌属于弧菌属并且是一个新种。它的补体结合的斜线不与任何其他菌种的斜线重叠。这也和以前表型特征的研究结果是一致的^[13]。根据各种之间的免疫距离所绘制的三度空间的模型表明，东方弧菌和许多海洋弧菌较接近（包括一些常见的种，如：*V. harveyi*、*V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus*、*V. pelagius*、*V. nereis* 和 *V. campbellii* 等）。它最接近的海洋弧菌是菌株 77，两者都具有精氨酸双水解酶系统。

根据凝胶双向扩散实验的结果表明，尽管用了三种不同的抗血清，仍然把东方弧菌、哈维氏弧菌、美丽弧菌生物型 I 划分到弧菌属，而把明亮发光杆菌、鲑鱼发光杆菌划分到发光杆菌属，并且可区别到种。这一结果和过去表型特征的研究也是一致

的。

参 考 文 献

- [1] Munoz, J.: Methods of Immunology and Immunochemistry (by Williams, C. A. et al.) Vol. 3 Academic Press, New York, pp. 146—160, 1971.
- [2] Champion, A. B. et al.: In Biochemical and Immunological Taxonomy of Animals. (ed. C. A. Wright) Academic Press. New York, pp. 397—416, 1974.
- [3] Kustus, S. G. et al.: *J. of Bacteriology*, 122: 1006—1016, 1975.
- [4] Baumann, L. et al.: *Archives of Microbiology*, 119: 25—30, 1978.
- [5] Baumann, P. and L. Baumann.: *Annual Review of Microbiology*, 31: 39—61, 1977.
- [6] Wilson, A. C. et al.: *Annual Review of Biochemistry*, 46: 573—639, 1977.
- [7] Bang, S. S. et al.: *Archives of Microbiology*, 130: 111—120, 1981.
- [8] Baumann, L. et al.: *Current Microbiology*, 4: 133—138, 1980.
- [9] Baumann, L. et al.: *ibid.*, 3: 191—196, 1980.
- [10] Baumann, P. et al.: *Annual Review of Microbiology*, 37: 369—398, 1983.
- [11] Puget, K. et al.: Superoxide and Superoxide Dismutases. (ed. Michelson, A. M. et al.) Academic Press, London, pp. 139—150, 1977.
- [12] 杨颢康等: 上海师范大学学报, 3: 89—92, 1980.
- [13] Yand, Y. et al.: *Current Microbiology*, 8: 95—100, 1983.
- [14] Puget, K. et al.: *Biochimie*, 56: 1255—1267, 1974.

THE APPLICATION OF IMMUNOLOGICAL STUDIES OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN DETERMINING THE RELATIONSHIPS BETWEEN *VIBRIO ORIENTALIS* AND SOME MARINE BACTERIA

Yang Yikong Zhu Wenjie Wu Zirong

(East China Normal University, Shanghai)

Linda Baumann Paul Baumann

(University of California, Davis Campus, U. S. A.)

Using antiserum to SOD from *V. alginolyticus* 90, *V. splendidus* biotype II2, *V. fischeri* 61 and *V. cholerae* M13, we have determined immunological distance of strains 715, 716 and 717 of *V. orientalis* by microcomplement fixation technique. The combined results for all the three strains (expressed as mean \pm standard deviation) were 6.4 ± 0.1 , 23.5 ± 0.2 , 26.0 ± 0.8 and 59.2 ± 0.4 ImD units, respectively. The results indicated that *V. orientalis* is different from other species in genus *Vibrio*. A three dimensional model was presented. It represents these results covering only those species and strains of *Vibrio*

with an SOD similar to the enzymes from *V. orientalis*. According to the characteristics of its SOD, *V. orientalis* is closely related to the relatively large group of primarily marine *Vibrio* species which includes such common species as *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagius*, *V. nereis* and *V. campbellii*. Its nearest neighbour is strain 77. Both *V. orientalis* and strain 77 have an arginine dihydrolase system.

Key words

Superoxide dismutase; *Vibrio*; Marine bacteria; Immunology