

## 嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析

涂小林\* 陆承平

(南京农业大学兽医系, 南京 210014)

从患暴发性传染病的家养鲫鱼分离到嗜水气单胞菌, 其培养物经硫酸铵沉淀, DEAE-纤维素层析及 Sephadex G100 凝胶过滤纯化, 获得一种单一多肽的外毒素, 分子量为 52.5kd。该毒素对热敏感, 对胰酶有抗性, 最适 pH5—8, 具有溶血性、肠毒性和细胞毒性, 腹腔注射致死小白鼠和鲫鱼, 其生物学活性可被同源抗毒素中和。鉴于该毒素的独特性质, 建议命名为 hec 毒素。

**关键词** 嗜水气单胞菌; hec 毒素; 溶血性

嗜水气单胞菌在自然界尤其在水体环境中分布甚广, 能引起人和动物的多种疾病<sup>[1-3]</sup>, 特别是淡水鱼暴发性传染病。1989 年以来, 该病在我国东南各地广泛流行, 尤以水温较高的夏秋季为剧, 导致鲫、鳊、鲢等主要养殖鱼类大量死亡, 给渔业生产造成重大经济损失<sup>[4, 5]</sup>。

嗜水气单胞菌在习惯上被认为是条件致病菌, 随着对细菌本身的研究的深入, 这一认识正在被修正。已有报道该菌的 O 抗原、菌毛及一些表面的非特异性粘附因子与该菌的致病性有关<sup>[6-8]</sup>。然而, 更多的报道指出致病株能产生细胞外毒素, 而毒素与致病关系密切<sup>[9-11]</sup>。

目前, 有关嗜水气单胞菌的病例国内已有报道, 但对其外毒素尚未见报道。国外的研究也开始不久, 而且关于毒素的种类和性质诸说不一, 未有定论。作者对我国分离的、对鱼致病的嗜水气单胞菌毒素进行了研究, 以确定其种类和性质。

### 材料和方法

#### (一) 菌种

嗜水气单胞菌 J-1 株系陈怀青等从江苏省江宁县某养殖场患暴发性传染病的鲫鱼分离鉴定, 并在联邦德国慕尼黑大学兽医微生物研究所进一步鉴定。

#### (二) 细菌培养

嗜水气单胞菌 J-1 株接种肉汤培养基, 35℃ 培养 24 小时后移种改良肉汤培养基, 摇床培养 35℃, 180r/min, 18—20 小时, 培养物经 10000r/min 离心 30 分钟, 取上清液。

#### (三) 毒素的提纯

1. 硫酸铵分级盐析: 细菌培养物上清液中加入硫酸铵至 20% 的饱和度, 4℃ 静置 4

本文于 1991 年 11 月 19 日收到。

\* 现在工作单位: 上海水产大学养殖系。

承陈怀青硕士大力协助; 杜念兴和徐为燕教授指导; 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心夏德全研究员、本校黄为一副教授以及江苏农学院董国雄副教授给予指导和帮助, 特此一并致谢。

小时, 10000r/min 离心 30 分钟, 弃沉淀。于上清液中加入硫酸铵至 60% 的饱和度, 4℃ 静置 4 小时, 10000r/min 离心 30 分钟, 去上清液, 沉淀溶于 50mmol/L Tris-HCl (pH7.8) 缓冲液中, 对相同缓冲液透析过夜, 即为粗提毒素。

2. DEAE-纤维素层析: 将粗提毒素装 DEAE-纤维素柱 (Pharmacia 产品, 2.6 × 30cm, 经 50mmol/L Tris-HCl, pH7.8 的缓冲液平衡), 以 0—1mol/L NaCl, 50mmol/L Tris-HCl (pH7.8) 缓冲液梯度洗脱, 流速为 5ml/cm<sup>2</sup> · h, 每管收集 4ml, 用紫外检测仪 (上海第三分析仪器厂产品) 280nm 进行检测, 经活性测定后合并生物活性部分, 用生物大分子浓缩胶 (复旦大学生生化教研组研制) 浓缩。

3. Sephadex G 100 凝胶过滤: 将上述浓缩液于 10℃ 装 Sephadex G100 柱 (Pharmacia 产品, 1.6 × 100cm, 平衡液及洗脱液均为 50mmol/L Tris-HCl, pH7.8), 流速为 12ml/cm<sup>2</sup> · h。合并有生物活性部分, 浓缩, 透析后得纯品。

#### (四) 高压液相色谱

提纯毒素上高压液相色谱仪 (日本 Waters 公司产品)。蛋白柱 I-125 预先用甲醇水溶液 (85/85 V/V) 冲洗 30 分钟, 再用 50mmol/L PBS (pH6.5) 平衡, 用相同缓冲液洗脱, 流速为 1ml/min 于 220nm 处自动检测。

#### (五) SDS-PAGE

提纯毒素分别加电泳载样缓冲液 I (含 10% 2 巯基乙醇) 及 II (不含 2 巯基乙醇), 沸水浴 5 分钟处理, 采用 Laemmli<sup>[11]</sup> 不连续 SDS-PAGE 系统, 浓缩胶为 2.5%, 分离胶为 10%, 室温下 30mA 电泳 6—7 小时, 用铵银法染色。

#### (六) 溶血价测定

毒素用 50mmol/L Tris-HCl (pH7.8) 在微量板上倍比稀释, 然后加等体积的 1% 人红细胞, 置 37℃ 1 小时、4℃ 1 小时后判定结果, 以 50% 溶血的最高稀释度为溶血价。

#### (七) 细胞毒性测定

将无菌处理后的毒素用无血清 MEM (日本制药株式会社产品) 液作倍比稀释, 加入长满单层 Vero 细胞 (非洲绿猴肾细胞系, 175 代, 公安部南京警犬研究所惠赠) 的 96 孔微量板内, 每孔 100μl。置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 24 小时, 观察细胞病变情况, 并按 Gentry<sup>[12]</sup> 方法, 用甲醇、结晶紫染色。参照病毒 TCID<sub>50</sub> 滴定方法, 按 Reed-Muench 法计算 CD<sub>50</sub> 的效价。

#### (八) 毒素稳定性测定

1. 热对毒素活性的影响: 毒素在 56℃ 和 100℃ 分别处理 30 秒, 1、2、5、10、30、60 分钟, 以及在 37℃ 处理 1、2、3、5、7、14、21、30 天, 以不经热处理毒素作对照, 测其 Vero 细胞毒价。

2. pH 对毒素活性的影响: 调节毒素的 pH 值, 使其分别为 2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、11 等, 于 37℃ 作用 1 小时后, 再调回 pH 到 7.0, 调整一致体积后, 测其活性。

3. 胰酶处理: 用 0.25% 胰酶 (Difco 进口分装, 批号 860623) 按 1:10 (酶/毒素蛋白 W/W) 处理毒素, 于 37℃ 作用 1 小时后, 加入等体积 10% 血清 MEM 液中和胰酶活性, 测其 Vero 细胞毒价, 以相同含量的胰酶与含血清的 MEM 液作对照。

#### (九) 溶血谱

采取鲫、鳊、鲢、鳙、鳝、乌鳢、牛蛙、鳖、蛇、鸡、鹅、小白鼠、兔、绵羊、山羊、牛、狗等动物及人的红细胞,制成 1% 悬液,分别测毒素对其溶血价。

### (十) 家兔肠绊试验

采用体重 2kg 左右的家兔,预先饥饿 48 小时,以无菌手术切开腹壁,自盲肠游离端处的回肠开始,沿向心方向结扎,注射段 5—6cm 长,间隔段 2—3cm,每段注射 1ml。用大肠杆菌 ETECTM128 菌株的 CAYE-2 培养物无菌滤液作阳性对照,用肉汤培养基作阴性对照。缝合切口,18 小时后剖杀动物,取出肠结扎段,测每厘米肠结扎段中液体蓄积量。

### (十一) 动物致死试验

1. 小白鼠  $LD_{50}$  测定:提纯毒素作 5 倍稀释,每一稀释度腹腔注射小白鼠 4 只,每只 0.1ml,观察 48 小时。

2. 鲫鱼  $LD_{50}$  测定:提纯毒素 10 倍稀释,每一稀释度腹腔注射鲫鱼 5 尾,鲫鱼全长 12—15cm,每尾注射 0.1ml,水族箱内观察 48 小时,水温 22℃。

### (十二) 毒素抗体制备

按常规方法免疫健康家兔 2 只,用琼脂扩散试验测定抗体效价,达 1:16 时采血,取血清。

### (十三) 中和试验

按病毒中和试验方法。用制备的兔抗毒素血清作倍比稀释,与等体积毒素(工作浓度为 4 倍  $CD_{50}$  浓度)混合,置 37℃ 1 小时后测其 Vero 细胞毒价,用无血清 MEM 作细胞维持液对照,用工作浓度的毒素作毒素效价对照,用零号血清(即免疫前家兔血清)作阴性对照。观察细胞病变及其抑制情况。

## 结 果

### (一) 毒素的纯化

经硫酸铵沉淀后的粗提毒素蛋白回收率为 11.59%。在 DEAE-纤维素层析和 Sephadex G100 凝胶过滤过程中,其洗脱液蛋白峰与溶血峰和细胞毒性峰基本吻合(图 1、2)。提纯毒素经高压液相色谱分析为单一峰(图 3),可以认为所得制品是具有生物活性的均一品。

### (二) SDS-PAGE

毒素经 2 巯基乙醇处理和不处理进行 SDS-PAGE,银染后均显示一条带,以分子量的对数对各标准蛋白的迁移率作图,从标准曲线得出该毒素的分子量为 52.5kd。

### (三) 稳定性试验

毒素在 56℃ 处理 1 分钟活性下降 80% 以上,2 分钟活性完全丧失。100℃ 处理 1 分钟活性完全丧失。37℃ 处理 3 天活性无变化,7 天下降 80%,14 天下降 97%。毒素在 pH5—8 范围内活性基本稳定(图 4)。经胰酶处理毒素活性不下降。

### (四) 溶血谱

毒素能溶解许多动物及人的红细胞,其中对鲤科鱼类的鲫、鳊、鲢及鳙鱼的溶血性最强,达  $15.23 \times 10^3 \text{HU}/\text{mg}$ ,对牛蛙、乌鳢、鹅、绵羊、山羊的溶血性最弱(表 1)。

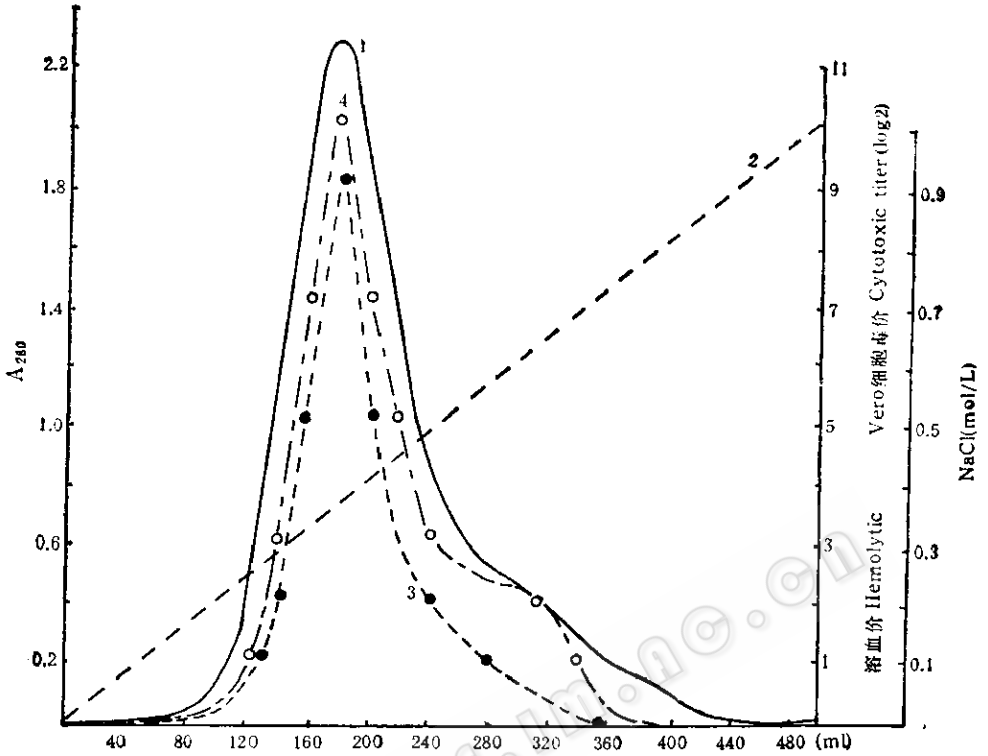


图1 毒素的DEAE-纤维素层析

Fig. 1 DEAE-cellulose chromatography

1.洗脱曲线 Protein contents; 2. NaCl梯度 NaCl concentration; 3.溶血曲线 Hemolytic activity; 4. Vero 细胞 Cytotoxicity for Vero cell.

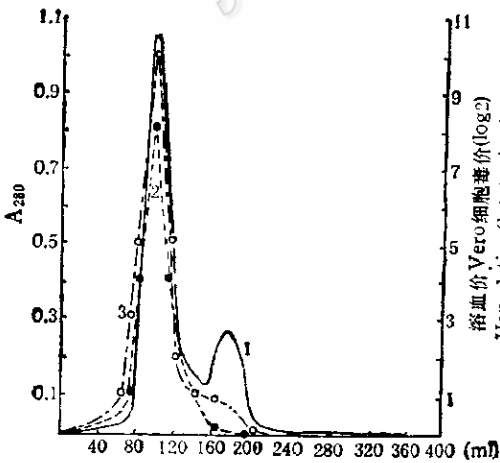


图2 毒素的Sephadex G100层析

Fig. 2 Sephadex G100 gel filtration

1.洗脱曲线 Protein contents; 2.溶血曲线 Hemolytic activity; 3. Vero 细胞毒性曲线 Cytotoxicity for Vero cell.

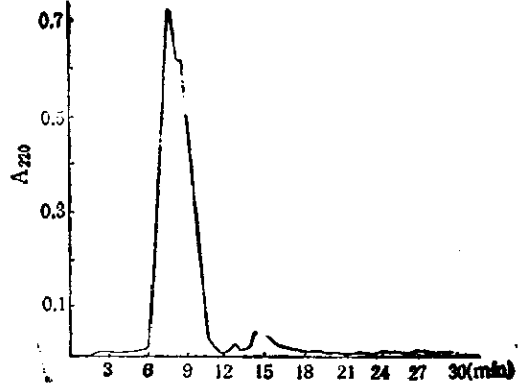


图3 毒素的HPLC I 125洗脱曲线

Fig. 3 HPLC of the toxin

### (五) 细胞毒性

毒素引致 Vero 细胞病变,使细胞变圆、脱落。CD<sub>50</sub> 为 0.26 $\mu$ g。

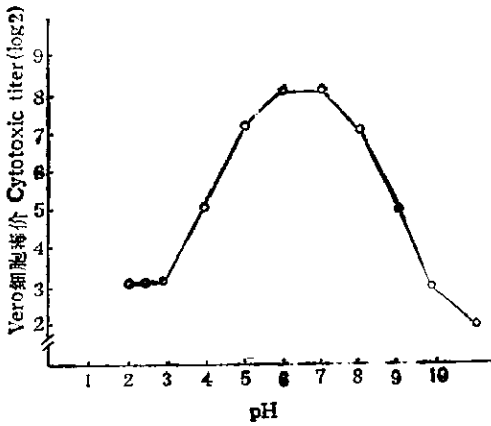


图4 pH对毒素活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on the toxin activity

### (六) 肠毒性试验

毒素引致家兔肠道内液体积聚,肠蠕动试验阳性。ETEC 阳性对照阳性,肉汤对照阴性。

### (七) 动物致死试验

1. 小白鼠注射后 40 分钟出现运动减少、呼吸加速等症状,严重者四肢麻痹、闭眼、不食。5 小时后开始死亡。剖检见脾肿大、边缘变钝,其余脏器无明显变化。连续观察 48 小时后记录死亡数,按 Reed-Muench 法计算出小白鼠 LD<sub>50</sub> 为 10<sup>2.425</sup> LD<sub>50</sub>/ml, 或 3.58 $\mu$ g。

2. 鲫鱼注射后 5 小时开始死亡,表现为典型体表出血。连续观察 48 小时记录结果,同上法算出 LD<sub>50</sub> 为 10<sup>2.375</sup> LD<sub>50</sub>/ml, 或 4.44 $\mu$ g。

### (八) 毒素中和试验

兔抗毒素血清能中和毒素,抑制毒素对 Vero 细胞所致的病变。中和毒素的血清效

表 1 毒素的溶血谱

Table 1 Hemolytic ability of the toxin

红细胞来源 Erythrocytes	溶血价 Hemolytic titer ( $\times 10^3$ HU/mg)
鲫鱼 Crucian carp	15.23
鳊鱼 Bream	15.23
鲢鱼 Silver carp	15.23
鳙鱼 Bighead carp	15.23
鳝鱼 Rice eel	1.90
乌鱼 Snakehead	0.48
牛蛙 Bullfrog	0.24
鳖 Soft-shelled turtle	0.95
蛇 Snake	3.81
鸡 Chicken	0.95
鹅 Goose	0.24
小白鼠 Mice	3.81
兔 Rabbit	7.62
绵羊 Sheep	0.24
山羊 Goat	0.24
水牛 Buffalo	3.81
狗 Dog	3.81
人 Human	3.81

价为 1:1280。零号血清无中和作用,毒素对照显示细胞病变,其毒价维持在原有水平。

## 讨 论

对嗜水气单胞菌毒素的种类和性质目前诸说不一,根据各自的试验结果分别称为溶血素、细胞毒素、肠毒素、皮肤坏死因子、迟发性渗透因子、上皮细胞粘附因子、蛋白酶、核酸酶等。本实验所用的对鱼有致病性的菌株是否产生毒素,毒素的性质如何,则是关键所在。

本实验所用嗜水气单胞菌菌株的培养物经硫酸铵沉淀、DEAE-纤维素层析及 Sephadex G100 层析得到一种毒素。经高压液相色谱分析为单一峰,SDS-PAGE 为一条带,说明该毒素为单一多肽分子,不可能是细菌内毒素,也不具有典型细菌外毒素的 A、B 亚基结构。该毒素具有溶血性、肠毒性和细胞毒性,腹腔注射致死小白鼠和鲫鱼,且致死的鲫鱼出现与自然感染嗜水气单胞菌相似的出血症状。该毒素最适 pH5—8,不耐热,对胰酶有抗性,而且能被其抗毒素中和。据此,均表明该毒素性质独特,有别于其它已知细菌毒素,根据其生物学活性即溶血性、肠毒性和细胞毒性的英文名称“hemolytic activity, enterotoxicity and Cytotoxicity”,分别取其第一个字母,建议将这种细菌毒素命名为 hec 毒素<sup>[4]</sup>。

进一步将 hec 毒素与文献记载的霍乱肠毒素 (Cholera toxin, CT)、志贺氏毒素 (Shige toxin, ST)、类志贺氏毒素 I 和 II (Shigelike toxin I, II, VT-1, VT-2)、大肠杆菌耐热和不耐热肠毒素 (*E. coli*-LT, *E. coli*-ST) 及金黄色葡萄球菌  $\alpha$  毒素 ( $\alpha$ -toxin) 的特性作比较,除 *E. coli*-ST 与  $\alpha$ -toxin 以外,其余均具有 A、B 亚基结构,而 *E. coli*-ST 分子量为 4kd,  $\alpha$ -toxin 为 26—36kd<sup>[5-21]</sup>。可见,hec 毒素无论是分子结构还是分子量与上述的典型细菌毒素均不相同,而且同时具有溶血性、肠毒性和细胞毒性等三种生物学活性的,也只有 hec 毒素,其它毒素都不能三性兼有。

Asao (1984) 和 Rose (1989) 分别报道从腹泻病人粪样分离到嗜水气单胞菌,从其培养物中提纯一种毒素,Asao 命名为溶血素 (hemolysin),它具有溶血性、细胞毒性和肠毒性,分子量为 50kd<sup>[22]</sup>; Rose 则命名为细胞毒性肠毒素 (cytolytic enterotoxin),它具有溶血性、肠毒性和细胞毒性,为 52kd 的单一多肽分子<sup>[23]</sup>。以上两人所报道的毒素与本研究获得的 hec 毒素性质基本相符,但名称不一,溶血素或细胞毒性肠毒素都不能全面概括该毒素的基本特点,不如 hec 名称准确而简便。

Asao 和 Rose 等从腹泻病人粪样中分离到的嗜水气单胞菌与我们从病鱼分离到的菌株来源迥异,但所产生的毒素基本性质相似,这一结果可为阐明嗜水气单胞菌的致病机理提供启示。

## 参 考 文 献

- [1] Bhat, S. et al.: *Ind. J. Med. Res.*, 62:1051—1060, 1974.
- [2] Kapper, J. B. et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 50: 359—377, 1984.
- [3] Shotts, E. B. J. et al.: *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 161:603—607, 1972.
- [4] 孙其焕等:水产学报,15(2): 130—139,1991.
- [5] 陈怀青、陆承平:南京农业大学学报,14(4): 87—91,1991.
- [6] Dooley, J. S. G. and T. J. Trust: *J. Bacteriol.*, 170: 499—506, 1988.

- [ 7 ] Lallier, R. and P. Daigneault: *J. Fish Dis.*, **7**: 505—512, 1984.
- [ 8 ] Mittal, K. R. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **26**: 1501—1503, 1980.
- [ 9 ] Allan, B. J. and R. M. Stevenson: *ibid.*, **27**: 1114—1122, 1981.
- [ 10 ] Annapurna, E. and S. C. Sanyal: *Med. Microbiol.*, **10**: 317—323, 1977.
- [ 11 ] Cumberbatch, N. et al.: *Infect. Immun.*, **23**: 829—837, 1979.
- [ 12 ] Gentry, M. K. and J. M. Dalrymple: *J. Clin. Microbiol.*, **12**: 361—366, 1980.
- [ 13 ] Laemmli, U. K.: *Nature (London)*, **227**: 680—685, 1970.
- [ 14 ] Lu Chengping et al.: 14th Annual AFS/PHS Meeting, 32th Western Fish Disease Conference, Newport, Oregon, August 1991.
- [ 15 ] 祝文娟: 细菌毒素研究进展, 第 4—5 页, 人民卫生出版社, 北京, 1987。
- [ 16 ] O'Brien, A. D. et al.: *Infect. Immun.*, **40**: 675—683, 1983.
- [ 17 ] Dickie, N. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **27**: 1973—1978, 1989.
- [ 18 ] Padhye, V. V. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **139** 424—430, 1986.
- [ 19 ] Yutsudo, T. et al.: *Microbiol. Pathogen.*, **3**: 21—30, 1987.
- [ 20 ] 赵 彪、戚正武: 细菌毒素研究进展, 第 232—244 页, 人民卫生出版社, 北京, 1987。
- [ 21 ] 顾克洲: 细菌毒素研究进展, 第 39—61 页, 人民卫生出版社, 北京, 1987。
- [ 22 ] Asao, T. et al.: *Infect. Immun.*, **46**: 122—127, 1984.
- [ 23 ] Rose, J. M. et al.: *ibid.*, **57**: 1165—1169, 1989.

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HEC TOXIN PRODUCED BY *AEROMONAS HYDROPHILA*

Tu Xiaolin Lin Chengping

(Department of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014)

An extracellular toxin produced by *Aeromonas hydrophila* from cultured crucian carp with septicemia was detected. The toxin was purified by ammonium sulfate precipitation, DE-AE-cellulose chromatography and Sephadex G-100 gel filtration. The factor was a single polypeptide with a molecular weight of 52.5kd determined by SDS-PAGE. The heat-stable toxin possesses hemolytic, enterotoxic and cytolytic activities. The hemolytic activity on human erythrocytes was  $3.81 \times 10^8$  HU/mg,  $CD_{50}$  for Vero cell was 0.26 $\mu$ g. The  $LD_{50}$  for crucian carp and mice was 4.44 $\mu$ g and 3.58 $\mu$ g respectively. The toxin was neutralized by homologous antibodies. The toxin shows unique characteristics as compared with other known bacterial toxins therefore the authors propose to name the toxin "hec" toxin.

**Key words** *Aeromonas hydrophila*; he toxin; Hemolytic activity