

弧菌标准菌株外膜蛋白的比较研究*

张晓华¹ Robertson P². Austin B². 徐怀恕¹

(1 青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

(2 英国 Heriot-Watt大学生物学系 爱丁堡)

摘要 对 32 种弧菌标准菌株的外膜蛋白 (OMP) 进行了比较研究。32 株弧菌标准菌株外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱各不相同。不同菌株的外膜蛋白有很大差异, 一般为 3~7 条, 分子量范围为 91000~14000。多数菌株有相同的主要外膜蛋白如 54000, 43000 和 27000 为许多菌株所共有, 但未发现所有菌株共同的外膜蛋白。

关键词 弧菌, 标准菌株, 外膜蛋白, SDS-PAGE

弧菌属是生存在淡水与海水环境中的一大类革兰氏阴性杆菌, 其轴或直或弯。通常以单极生鞭毛运动。细胞色素氧化酶阳性, 对 O / 129 敏感, 可以 D-葡萄糖为唯一的或主要的碳源和能源进行呼吸和发酵。现已发现越来越多的弧菌可引起人类、海洋无脊椎动物和海洋脊椎动物的疾病。如霍乱弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、梅氏弧菌、哈维氏弧菌、河弧菌及鳃弧菌^[1~3]等。进一步对这一类群细菌的致病性研究很有必要。

革兰氏阴性菌细胞壁的最外层由蛋白质、脂蛋白和脂多糖构成, 称“外膜 (Outer membrane)”。外膜蛋白构型的比较研究对致病菌或临床上重要的细菌的流行病学研究有重要作用。而且因为外膜蛋白参与抗原反应, 外膜蛋白的 SDS-PAGE 提供了另一个血清型技术^[4]。

从细菌中提取外膜蛋白有多种不同的方法, 其主要方法一是可用不连续蔗糖梯度超速离心得到细菌外套, 再进一步提取外膜^[5], 一是可用 EDTA 等处理细菌细胞壁使外膜从整个细菌上释放出来^[6]。作者按改进的 Poxton^[6]的方法提取了 32 个弧菌标准菌株的外膜蛋白, 并对其进行了比较研究。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

弧菌标准菌株 72, 280, 281, 283, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 314, 611 和 *V. logei* 均来自英国 Heriot-Watt 大学生物学系 (表 1)。

*欧洲共同体“发展中国家生命科学技术计划”资助项目, 资助号为 STD₃ (TS3-CT94-0269)。

本研究的主要工作在英国 Heriot-Watt 大学生物学系进行。

本文于 1997 年 2 月 17 日收到。

表1 供试弧菌标准菌株

Table 1 Type strains of *Vibrio* sp. used in this study

细菌名称	菌号	来源
Bacterial species	Lab. code	Source
鳗弧菌	<i>V. anguillarum</i>	72 LMG4437
	<i>V. adaptus</i>	280 LMG7889T
辛辛那提弧菌	<i>V. aestuarianus</i>	281 LMG7909T
溶藻胶弧菌	<i>V. alginolyticus</i>	283 LMG4408T
坎贝氏弧菌	<i>V. campbelli</i>	285 LMG11216T
	<i>V. carchariae</i>	286 LMG7890T
	<i>V. cincinnatiensis</i>	287 LMG7891T
肋生弧菌	<i>V. costicola</i>	288 LMG6460T
	<i>V. damsela</i>	289 LMG7892T
	<i>V. diazotrophicus</i>	290 LMG7893T
费氏弧菌	<i>V. fischeri</i>	291 LMG4414T
河弧菌	<i>V. fluvialis</i>	292 LMG7894T
	<i>V. furnissi</i>	293 LMG7910T
产气弧菌	<i>V. gazogenes</i>	294 LMG13541T
哈维氏弧菌	<i>V. harveyi</i>	295 LMG4044T
地中海弧菌	<i>V. mediterranei</i>	296 LMG11258T
梅氏弧菌	<i>V. metschnikovii</i>	297 LMG11664T
	<i>V. mimicus</i>	298 LMG7896T
飘浮弧菌	<i>V. natriegens</i>	299 LMG10938T
	<i>V. navarrensis</i>	300 LMG13543T
海若虫弧菌	<i>V. nereis</i>	301 LMG3895T
黑丽弧菌	<i>V. nigripulchritudo</i>	302 LMG3896T
	<i>V. orientalis</i>	303 LMG7897T
海弧菌	<i>V. pelagius</i>	305 LMG3897T
溶肌弧菌	<i>V. proteolyticus</i>	306 LMG3772T
	<i>V. ordalii</i>	307 LMG13544T
亮弧菌	<i>V. splendidus</i>	308 LMG4042T
	<i>V. tubiashii</i>	309 LMG10936T
创伤弧菌	<i>V. vulnificus</i>	310 LMG13545T
	<i>V. hollisae</i>	314 CIP101886
副溶血弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>	611 ATCC33844
	<i>V. logei</i>	

1.2 外膜的制备

弧菌标准菌株接种在 Marine Agar (DIFCO) 平板上, 于 25℃ 培养 48h。将菌苔收集至 9ml PBS, 振荡均匀。将细菌在 4℃ 离心洗涤三次 (6000r / min, 15min), 于波长 525nm 处读取菌液的 OD 值。若 OD 值大于 2.000, 则能收集到足够的外膜蛋白。离心去上清液, 向含沉积菌团的离心管中加入 2ml 含有 10mmol / L EDTA 和 2mmol / L PMSF (苯基甲基磺酰氟, 蛋白酶抑制剂) 的 PBS 并混匀, 45℃ 水浴 30min, 然后超声波处理 2min (DECON FS300)。将样品分装至小离心管, 4℃ 离心 15min (Eppendorf, 14 000r / min)。仔细地取出上清液, -20℃ 保存。

1.3 外膜样品中蛋白质含量的测定

样品中总蛋白质的含量用 Bio-Rad 试剂 (Bio-Rad 实验室, Munich) 进行测定。将样品与染料试剂 (Bio-Rad) 培养后在 595nm 处测定吸收值。从标准曲线查得每个样品的蛋白质浓度。

1.4 从外膜样品中提取总蛋白

每个样品的蛋白质浓度确定后, 将样品中加入 3 倍样品剂量的丙酮, 在 -20℃ 保存

15min, 然后 4℃ 离心 15min (14 000r / min)。仔细地去除上清液, 加入不同体积的 SDS-PAGE 样品缓冲液使每个样品中含有相同的蛋白质浓度即 250μg / ml。

1.5 SDS-PAGE

采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳^[7]。丙烯酰胺浓度: 分离胶 12% (V / V), 浓缩胶 4% (V / V)。每孔加 10μl 样品, 在 150V 的恒压下电泳 1.5h。电泳结束后, 采用考马斯

亮蓝 R500 (Sigma) 染色。除所测样品外, 所有胶中都含有商品化的 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白 (Bio-Rad), 即兔肌肉磷酸化酶 B (97400); 牛血清白蛋白 (66200); 鸡蛋卵清蛋白 (45000); 牛碳酸酐酶 (31000); 大豆胰蛋白酶抑制因子 (21500) 和鸡蛋清溶菌酶 (14500)。

1.6 蛋白质分子量的测定

胶中主要蛋白带的分子量据 Pharmacia 公司电泳标准曲线手册进行计算。此方法据已知分子量蛋白质的相对位置确定未知蛋白质的分子量。这样, 标准蛋白的相对移动值 (Rf) 以下列方程计算:

$Rf = \text{蛋白质从起点移动的距离} / \text{从起点到参考点的距离}$ 。以染料的前缘为参考点, 并以 Rf 为横坐标, 标准蛋白分子量的对数值为纵坐标绘制标准曲线。

测定样品蛋白带的移动距离并计算 Rf 值, 从标准曲线上查得未知蛋白质分子量的对数值, 并计算其分子量。

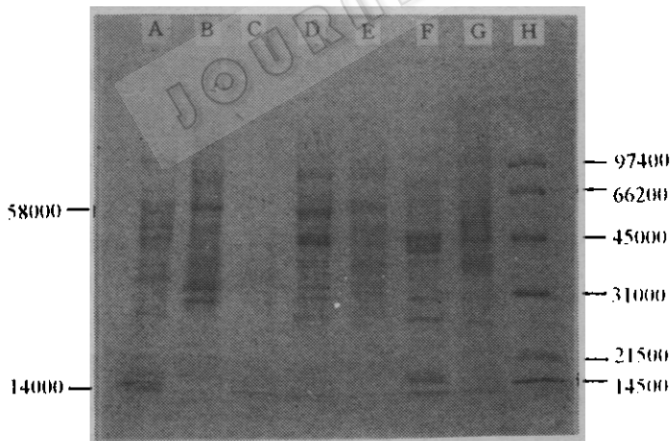


图 2 6 株弧菌标准菌株的外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins prepared from 6 *Vibrio* type strains
Lanes: strains 281(A), 283(B), 285(D), 286(E), 288(F), 291(G), Molecular weight marker(H).



图 1 7 株弧菌标准菌株的外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 1 SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins prepared from 7 *Vibrio* type strains
Lanes: strains 280(A), 287(B), 289(C), 290(D), 293(E), 296(F), 297(G), Molecular weight marker(H).

2 结果

将 32 株弧菌标准菌株外膜蛋白进行了 SDS-PAGE, 其结果 (图 1~5) 可见, 32 株弧菌标准菌株外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱各不相同。主要的外膜蛋白不同菌株间有很大差异, 一般 3~7 条, 分子量为 91000~14000, 但多为 71000~25000。多数菌株间有相同的外膜蛋白, 如 54000, 43000 和 27000 为许多菌株所共有, 但未发

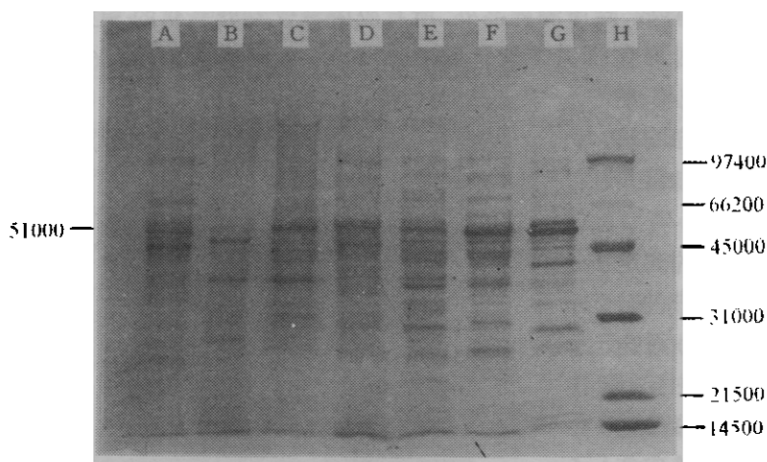


图3 7株弧菌标准菌株的外膜蛋白的 SDS-PAGE图谱

Fig. 3 SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins prepared from 7 *Vibrio* type strains

Lanes: strains 292 (A), 294(B), 295(C), 298(D), 299(E), 301(F), 305 (G), Molecular weight marker(H).

现所有菌株共同的外膜蛋白。另外,还发现一些菌株中有最主要的外膜蛋白,如菌株 287(47000), 293(30000), 283(58000), 301(49000), 305(51000), 306(32000), 314(30000), 310(71000)等。

3 讨论

关于弧菌的外膜蛋白,许多人进行了研究。其中研究较多的弧菌为副溶血弧菌^[8,9], 鳗弧菌^[10,11]和创伤弧菌^[12]。对这些弧菌外膜的研究主要集中于外膜蛋白的致病性、抗原保护性及金属离子对外膜蛋白合成的调控作用。

近些年弧菌属不断扩大。《伯杰细菌鉴定手册》第八版^[13]描述了5种弧菌,《伯杰细菌分类手册》^[14]报道了20种弧菌,到1993年弧菌的数目已超过34种^[15]。作者对32个弧菌标准菌株的外膜蛋白进行了比较研究,这为不同弧菌的致病性、抗原保护性研究提供了基础。对同一种细菌外膜蛋白的 SDS-PAGE图谱,不同人的结果有所不同^[8,12],可能与细菌的培养条件、制备外膜蛋白

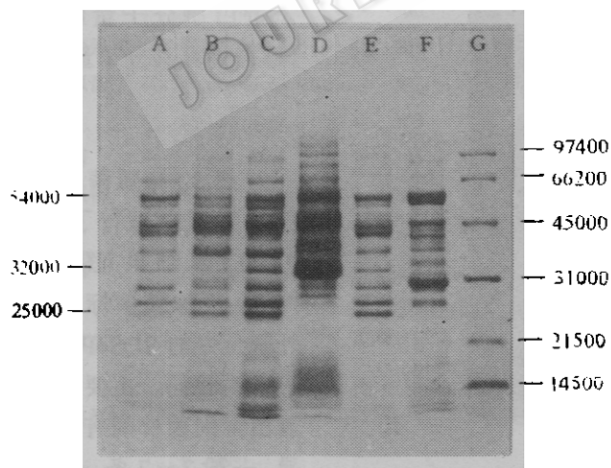


图4 6株弧菌标准菌株的外膜蛋白的 SDS-PAGE图谱

Fig. 4 SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins prepared from 6 *Vibrio* type strains

Lanes: strains 300(A), 302(B), 303(C), 306(D), 307(E), 314(F), Molecular weight marker(G).

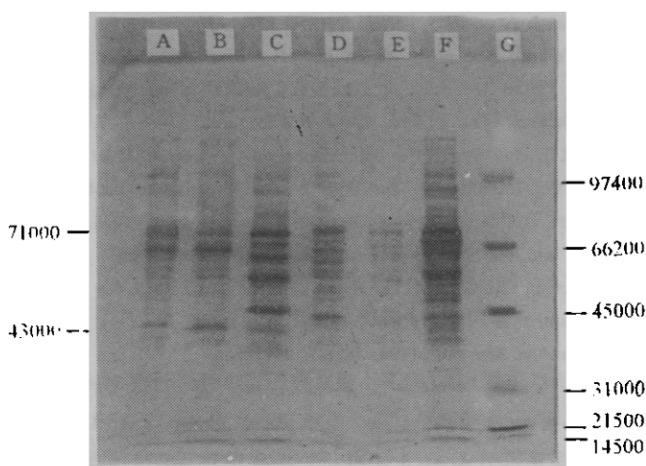


图5 7株弧菌标准菌株的外膜蛋白的 SDS-PAGE图谱

Fig. 5 SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins prepared from 7 *Vibrio* type strains

Lanes: strains 308(A), 309(B), 310(C), 611(D), 72(E), *V. logei*(F), Molecular weight marker(G)

的方法和菌株的不同有关^[8,16]。

32个弧菌标准菌株外膜蛋白的 SDS-PAGE图谱各不相同,表明弧菌的外膜蛋白有可能作为不同种的标志,即在弧菌鉴定上有一定意义。人们可通过肉眼观察电泳胶或其照片以比较未知菌株与标准菌株电泳图谱的相似性,确定细菌的种类。但对于大量样品的电泳图谱,则需通过计算机辅助比较而进行分类。多数菌株间有相同的外膜蛋白,这可能形成某些弧菌间的共同抗原。

前人的研究表明,同一种细菌的不同菌株的外膜蛋白图谱很相似但有小的差异,我们的结果也证实了这一点^[17],这些差异与菌株的血清型、致病性及生长条件有关^[12,18]。因此要对弧菌外膜蛋白全面了解,尚需选择不同血清型、致病性或生物型的同一种弧菌,在不同的条件下进行研究。

参 考 文 献

- [1] 许兵,纪伟尚,徐怀恕,等. 海洋学报, 1993, 15(1): 98~106.
- [2] Stelma G N, Reyes A L, Peeler J T et al. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 2776~2782.
- [3] Liu P C, Lee K K, Chen S N. *Lett Appl Microbiol*, 1996, 22: 413~416.
- [4] Vauterin L, Swings J, Kersters K. Protein Electrophoresis and Classification. In: *Handbook of New Bacterial Systematics*. New York: Academic Press, 1993, 267~268.
- [5] Hancock R E, Nikaido H. *J Bacteriol*, 1978, 136: 381~390.
- [6] Poxton I R. *J Clin Pathol*, 1979, 32: 294~298.
- [7] Laemmli U K. *Nature*, 1970, 227: 680~685.
- [8] Koga T, Kawata T. *J Gen Microbiol*, 1983, 129: 3185~3196.
- [9] Yamamoto S, Hara Y, Tomochika K et al. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, 128: 195~200.
- [10] Tolmasky M E, Wertheimer A M, Actis L A et al. *J Bacteriol*, 1994, 174(1): 213~220.

- [11] Simon M, Mathes A, Blanch A *et al.* *J Bacteriol*, 1996, **178**: 4182~4188.
- [12] Biosca E G, Garay E, Toranzo A E *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1993, **62**(3): 918~927.
- [13] Shewan J M, Veron M. Genus I. *Vibrio*. In: Buchanan R E *et al* ed. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1974. 340~345.
- [14] Baumann P, Schubert R H W. Family II. *Vibrionaceae*. In: Krieg N R *et al* ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 1984. 516~550.
- [15] Kita-Tsukamoto K, Oyaizu H, Nanha K *et al.* *Int J of System Bacteriol*, 1993, **43**(1): 8~19.
- [16] Lambert P A. Isolation and Purification of Outer Membrane Proteins from Gram-negative Bacteria. In: Hancock I. *et al* ed. *Bacteria Cell Surface Techniques*. Chichester: John Wiley and Sons, 1988. 110~121.
- [17] 张晓华, Robertson P, Austin B, 等. 中国水产科学, 1997(印刷中).
- [18] Koga T, Takumi K. *Microbiol Immunol*, 1994, **38**(12): 931~936.

COMPARISON OF OUTER MEMBRANE PROTEIN PROFILES OF *VIBRIO* SP.*

Zhang Xiaohua¹ Robertson P. Austin B. Xu Huaishu¹

(1 Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

(2 Heriot-Watt University, Edinburgh, United Kingdom)

Abstract The outer membrane protein (OMP) profiles of 32 *Vibrio* type strains have been compared. The major OMP profiles of different *Vibrio* species had a considerable heterogeneity. Most of the strains had 3~7 major OMPs, with molecular masses ranging between 91000 and 14000. Many strains had common major OMPs such as 54000, 43000 and 27000. However, no common major OMPs in all *Vibrio* type strains had been found.

Key words *Vibrio*, Type strains, Outer membrane protein, SDS-PAGE

*Acknowledgments Authors thank the commission of the European Communities under the STD₂(TS3-CT94-0269)program of "Life Sciences and Technologies for Developing Countries" for support of this research.