

文章编号:1000-0615(2001)03-0244-05

筛选用转座子 *Tn916* 诱变的具有免疫原性的嗜水气单胞菌蛋白酶缺失株

储卫华, 陆承平

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要:以携带质粒 pAM120(Apr, Tcr/*Tn916*)的大肠杆菌 CG120 株为供体菌,与受体菌嗜水气单胞菌 J-1 株,采用滤膜接合法进行接合转移,在选择平板(含 Tc, cfz 和脱脂奶)上进行筛选,筛选出 6 株蛋白酶缺失株(ECPase⁻), ECPase⁻ 菌株其生长速度,对正常鲫血清的抗性降低,用脱脂奶平板法及底物法检测,蛋白酶产量明显降低。与亲本 J-1 株相比,突变株致病力降低,对鲫的半数致死量大于 10⁸(J-1 株对鲫的半数致死量为 5 × 10³)。用 ECPase⁻ 突变株 MJ-1 株的 18h 培养物(5 × 10⁶CFU)接种健康鲫,不产生亲本 J-1 株引起的病变及死亡。用 MJ-1 活菌免疫鲫,在第 5 周产生较高的凝集抗体,且对强毒株 J-1 的攻击有保护作用。表明蛋白酶是嗜水气单胞菌的一个重要的毒力因子, ECPase⁻ 突变株仍具有免疫原性。

关键词:嗜水气单胞菌;胞外蛋白酶; *Tn916* 诱变

中图分类号:Q813.5 **文献标识码:**A

Screening the reduced virulent protease-deficient mutant of *Aeromonas hydrophila* by *Tn916* transposon insertions

CHU Wei-hua, LU Cheng-ping

(Key Lab of Animal Disease Diagnostic & Immunology of Ministry of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Cell conjugation was carried out between the donor *E. coli* CG120(pAM120: Apr, Tcr/*Tn916*) and the recipient *Aeromonas hydrophila* J-1 by filter mating. 6 protease-deficient mutant strains were screened by inoculation on TSA with 1.5% skim milk. MJ-1, one of the six mutants was further characterized by its growth rate, serum resistance and degree of virulence (LD₅₀). Unlike the parent strain, the growth rate and serum resistance of MJ-1 were decreased significantly, and there was no lesions in *Carrasius auratus ibebio* caused by parent strain J-1 after intramuscular injection with 5 × 10⁶ CFU germs of MJ-1. The 50% lethal dose of MJ-1 for the fish was more than 10⁸CFU. MJ-1 was tested in fish vaccination experiment, and its antibody evoked highest degree after 5 weeks intraperitoneal injection. After being challenged with the parent strain J-1, the survival abilities of vaccinated fish were higher than that of the unvaccinated control group. It shows that the protease is a virulent factor of *Aeromonas hydrophila* and the immunogenicity of ECPase⁻ mutant MJ-1 remains.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; extracellular protease(ECPase); *Tn916* mutagenesis

收稿日期:2000-03-07

资助项目:国家九五攻关子课题(96-005-03-01)

第一作者:储卫华(1972-),男,江苏东台人,博士生,主要从事动物微生物与免疫学研究。E-mail: chuwh@sina.com

通讯作者:陆承平(1945-),男,上海人,教授,主要从事鱼虾病原微生物学研究。Tel:025-4430825, E-mail: dvmi@njau.edu.cn

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)能致多种动物的败血症及人类的腹泻,尤其是淡水鱼的败血症^[1]。Ah的致病性与其分泌的胞外产物有关,研究表明与S-层蛋白、毒素、铁载体、胞外蛋白酶等有关^[2]。凌红丽等^[3]研究表明胞外蛋白酶和溶血素是嗜水气单胞菌的主要致病因子。将粗提的胞外产物(ECPs)注射鱼体能引起虹鳟鱼的死亡和组织损伤。将提纯的胞外蛋白酶腹腔注射鲫,引起鲫的死亡且出现典型的由Ah引起的败血症症状,而提纯的胞外蛋白酶肌肉注射鲫会引起注射部位组织液化、糜烂^[4]。已知Ah的胞外蛋白酶的结构基因位于染色体上,为了确定胞外蛋白酶(ECPase)的致病作用,将转座子插入细菌染色体,筛选缺陷型突变株,与亲本比较分析确定ECPase的作用。

*Tn916*是来源于革兰氏阳性菌粪链球菌(*Streptococcus faecalis*, DS16)的接合转座子,编码四环素抗性基因(Tcr),可以在多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌之间发生接合转移,具有广泛的宿主范围,可通过一种不依赖重组的切除-插入机制,插入到目的复制子的一个或多个位点^[5]。本试验用*Tn916*对Ah进行接合诱变,筛选ECPase⁻的突变菌株,以深入研究ECPase在Ah致病性中的作用及其对Ah免疫原性的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及培养

供体菌为大肠杆菌(*E. coli*)CG120携带质粒pAM120,携带*Tn916*,具有氨苄青霉素抗性(Ap^r),四环素抗性(Tc^r)标记,由加拿大Clewell博士惠赠。受体菌为嗜水气单胞菌J-1株,具有头孢唑啉抗性(cfz^r)标记,由本实验室分离鉴定并保存。

大肠杆菌在LB培养基中置37℃培养,Ah在蔗糖胰蛋白胨水中置28℃培养。蛋白酶的测定用含1.5%的脱脂奶TSA平板及底物法,所用抗生素的终浓度为:头孢唑啉(cfz)100μg·mL⁻¹,四环素(Tc)10μg·mL⁻¹,氨苄青霉素(Ap)25μg·mL⁻¹。

1.2 细菌的接合及ECPase⁻菌株的筛选

供体菌大肠杆菌CG120接种于LB培养基中,37℃摇床培养过夜,受体菌Ah接种于蔗糖胰蛋白胨水中,28℃摇床培养至对数生长期后期备用。分别取供体菌液和受体菌液按1:2(V/V)混合,总菌数约为10⁸CFU,轻轻摇匀后,4 000r·min⁻¹离心5min,收集菌体,用生理盐水洗涤1~2次,菌体溶于与原混合液等体积的生理盐水中,取100μL滴于孔径为0.45μm的灭菌微孔滤膜上,滤膜置不含抗生素的TSA平板表面,37℃培养24h后,将滤膜放置装有2mL生理盐水的三角烧瓶中,轻摇,洗下菌体,取100μL菌液连续10倍稀释,取100μL菌液涂布在含有Tc(10μg·mL⁻¹)、cfz(100μg·mL⁻¹)的含1.5%脱脂奶的TSA平板上,另取等量的菌液涂布在不含Tc、cfz的TSA平板上,以计算接合频率。37℃培养48h后,挑选没有明显溶蛋白圈的菌落作为ECPase⁻菌株。

1.3 *Tn916*在Ah中的稳定性

将ECPase⁻菌株在不含Tc的LB培养基中以1%接种量28℃摇床培养24h后,再以1%接种量接种于新鲜的LB培养基中,取100μL连续10倍稀释,涂布于含Tc和不含Tc的1.5%脱脂奶TSA平板上,37℃培养24h传10代。用含Tc的TSA平板上的菌落数与不含Tc的TSA平板上的菌落数之比乘以100%表示Ah转移接合子的稳定性。

1.4 ECPase⁻突变菌株特性

1.4.1 ECPase活性测定

将J-1、MJ-1、MJ-4接种于100mL的蔗糖胰蛋白胨水中,27℃摇床培养,参照李焕荣等的方法^[6],每隔12h用底物法测定酶活性。

1.4.2 ECPase⁻ 突变菌株的生长速度

将 J-1 接种于 LB 中, MJ-1 接种于 LB 以及含 2% 的甘氨酸和丙氨酸的 LB 中, 37℃ 摇床培养, 每隔 8h 测定细菌生物量 (A_{610})。

1.4.3 ECPase⁻ MJ-1 对正常鲫血清的抵抗力

将健康鲫用 MS-222(甲磺酸三卡因, SIGMA 公司)麻醉, 尾静脉采血, 分离血清。参照 Leung 等的方法^[7], 将在 TSB, 25℃ 培养 24h 的 MJ-1 菌体离心收集, 用 PBS 洗涤 3 次, 将菌体悬浮在灭菌的 TSB 中, 使菌液浓度为 2.0×10^7 CFU·mL⁻¹, 取 1mL 加入等量的血清, 25℃ 孵育, 每隔 1h, 取 100μL 菌液稀释涂布, 细菌计数。同时作亲本 J-1 株对血清抗性对照。

1.4.4 ECPase⁻ 突变菌株的溶血性

将突变菌株 MJ-1 接种于含 5% 的兔鲜血平板上, 28℃ 培养 24h, 观察其溶血性。

1.5 鱼体试验

异育银鲫 (*Carrassius auratus ibeio*, 以下简称鲫) 购自南京市水产研究所养殖场, 每尾约 100~150g, 在水温为 (27±1)℃ 的水族箱内充氧饲养, 水体积为 30L。观察 7d, 证实无病后, 用于试验。

根据 ECPase⁻ 突变株的特性, 以及脱脂奶平板上溶蛋白圈、血琼脂平板上溶血能力, 筛选 MJ-1 株用于鱼体试验。

1.5.1 鱼体感染进程试验

取证实无病的鲫, 分 3 组, 每组 14 尾, 背部肌肉注射 0.1mL 含 5×10^6 CFU 的 J-1 和突变菌株 MJ-1, 对照组注射相同量的生理盐水, 观察 7d, 每天每组采 2 尾, 取注射部位组织及肾脏约 5g, 研磨, 稀释, 涂布于 TSA 平板上, 比较细菌菌落数。

1.5.2 ECPase⁻ MJ-1 株半数致死量 (LD₅₀) 的测定

用无菌生理盐水将肉汤培养物 (培养 24h) 作连续 10 倍稀释, 稀释度为 $10^{-1} \sim 10^{-8}$, 用平板法进行细菌计数, 然后将 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 稀释度的细菌悬液分别腹腔接种 6 尾鲫, 每尾 0.2mL, 置水族箱内充氧饲养, 水温 20℃, 观察 7d, 按 Reed-Muench 法计算突变菌株 MJ-1 的半数致死量^[8]。

1.5.3 免疫保护试验

全菌凝集试验: 将 40 尾健康鲫随机分成 2 组, 试验组每尾腹腔注射 0.2mL 含 2×10^6 CFU 的 MJ-1, 对照组注射 0.2mL 的生理盐水, 每隔一周尾静脉采血, 分离血清, 参照 Roberson 等的方法^[9]进行微量板凝集试验, 检测鲫对 AhJ-1 的全菌凝集抗体。

攻击试验: 在接种 MJ-1 后第 6 周, 用 50LD₅₀ 的 J-1 攻击, 观察 7d, 记录死亡数, 并根据公式计算免疫保护率 (RPS), $RPS(\%) = (1 - \text{免疫组死亡数} / \text{对照组死亡数}) \times 100$ ^[10]。

2 结果

2.1 Tn916 接合转移诱变 Ah

用微孔滤膜接合法接合诱变, 用含 Tc、cfz 的 1.5% 脱脂奶 TSA 平板筛选 Ah ECPase⁻ 突变菌株, 获得 cfz^r、Tc^r 抗性接合子 1 532 个, 其接合频率约为 1.5×10^{-5} (按供体细胞计算), 筛选得无溶蛋白圈的菌株 6 株, 分别为 MJ-1~6。接合子的稳定性表明, 在无选择压力下 (不含 Tc 的 LB 培养基), 连续传代 10 代, ECPase⁻ MJ-1 中带有 Tc^r 的细菌可达 94.5%, 其他 5 株突变株也有较高的稳定性。分别在 80%~95.5% 之间。

2.2 鱼体试验结果

2.2.1 ECPase⁻ MJ-1 株 LD₅₀

将 MJ-1 株的 24h 含 2.2×10^9 CFU 菌液 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 稀释接种, 进行 LD₅₀ 测定, 7d 内仅 10^{-1} 组有 2 尾死亡, 表明 MJ-1 的 LD₅₀ 大于 10^8 , 可认为是无毒力菌株^[11](表 1)。

2.2.2 感染进程

注射 J-1 株组的 14 尾鲫 24h 内有 2 尾死亡, 未死者出现呼吸加快, 平衡失调。40h 时发现 14 尾全部死亡, 且注射部位出现肿胀、出血、糜烂、液化, 注射部位 24h 细菌达 7×10^5 CFU·g⁻¹, 死亡的鲫注射部位细菌则高达 10^8 CFU·g⁻¹; 而注射 MJ-1 的 14 尾鲫除被处死的以外无一死亡, 24h 注射部位细菌含量为 3×10^4 CFU·g⁻¹, 肾脏的细菌含量为 2.3×10^3 CFU·g⁻¹, 48h 以后注射部位细菌含量一直处于 10^3 CFU·g⁻¹ 的水平。

2.2.3 免疫保护试验结果

注射 0.2mL 含有 2×10^6 CFU MJ-1 的鲫在第 5 周时, 发现其全菌凝集效价最高, 达 1:2⁵, 第 6 周时用 50LD₅₀ 的 J-1 进行攻击, 结果发现用 MJ-1 免疫组的相对存活率为 60%。

2.3 ECPase⁻ 突变株特性

突变株蛋白酶的产量极低, 但有轻微的溶血性。在脱脂奶平板上经 48h 培养 MJ-1 无明显溶蛋白圈, 其余都有不同程度的溶蛋白圈, MJ-4 溶蛋白圈最大。用底物法测定蛋白酶活性, 发现 MJ-1、MJ-4 的蛋白酶产量与亲本株 J-1 相比明显降低(图 1), 突变株的生长速度也显著低于亲本株(图 2)。MJ-1 对正常鲫血清的抗性也降低(图 3)。

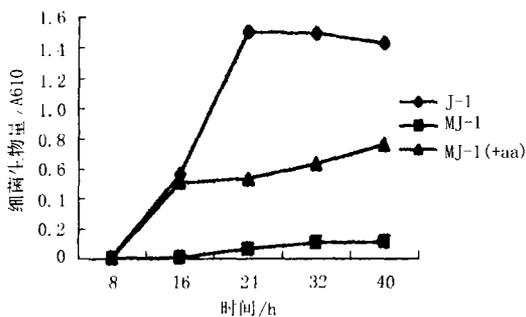


图 2 细菌生长速度

Fig.2 Growth rate of strains J-1, MJ-1

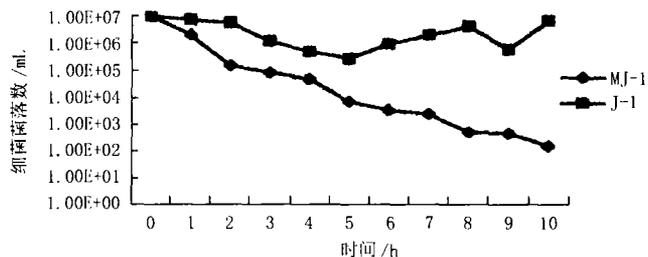


图 3 细菌对正常血清的抗性

Fig.3 Resistance of strains to normal serum

表 1 MJ-1 对异育银鲫的半数致死量

Tab.1 The LD₅₀ of ECPase⁻ MJ-1 to

C. auratus ibeio

细菌稀释度	接种细菌数(CFU)	接种鱼数	死亡鱼数
10^{-1}	2.2×10^8	6	2
10^{-2}	2.2×10^7	6	0
10^{-3}	2.2×10^6	6	0
10^{-4}	2.2×10^5	6	0
生理盐水	0	6	0

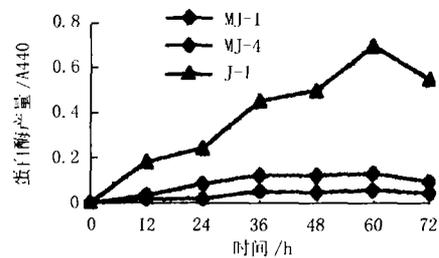


图 1 细菌蛋白酶产量活性测定

Fig.1 Protease production of strains J-1, MJ-1 and MJ-4

3 讨论

嗜水气单胞菌引起多种养殖鱼类的败血症, 其致病因子有多种, 究竟哪种致病因子在致病过程中起主导作用尚无定论, 而 ECPase 一直被认为是一种致病因子。许多研究都将 ECPase 的产生与致病性联系起来。Leung 和 Steverson^[12] 用转座子 (*Tn5*) 诱导嗜水气单胞菌获得蛋白酶缺失株, 没有改变细菌的其他特性; 他们同时将野生株与蛋白酶缺失株对虹鳟作攻毒试验, 背侧肌肉注射, 模拟自然损伤部位感染

Ah的过程,结果野生株使注射部位迅速感染,而注射蛋白酶缺失株的鱼并不引起疾病的症状。本试验用转座子 *Tn916* 诱导 Ah 蛋白酶缺失株获得成功, *Tn916* 带有 Tc 抗性,它以一种特殊的切离-插入机制,从供体质粒或染色体上切离的 *Tn916* 通过结合进入新的受体菌,就可以插入与其有同源序列的染色体或质粒上。嗜水气单胞菌的 ECPase 结构基因位于染色体上^[13],通过抗性和无溶蛋白圈即可筛选出蛋白酶缺失株。ECPase 缺失株 MJ-1 不产生蛋白酶,仅有轻微的溶血性,这可能是由于溶血素是以前体的形式分泌的它必须在蛋白酶的作用下,才能成为有活性的溶血素。试验中发现有轻微的溶血现象,则可能是由于有极少量的诱变子回复突变,成为带有蛋白酶基因的菌株。ECPase⁻ 缺失菌株 MJ-1 对正常鲫血清的抗性降低,对鲫的致病力降低,这与文献[12]的研究一致。

许多疫苗仅诱导有限的保护作用,且只在短期内有效,活的、减毒疫苗通常更为有效。毒力缺失株活减毒株作为疫苗免疫动物在兽医上广为应用,而在水产上尚未见报道。本试验研究发现 ECPase⁻ 突变株 MJ-1 的 LD₅₀ 大于 10⁸,可认为是一株无毒力菌株。其他几株突变菌株蛋白酶产量都高于 MJ-1,且都有轻微的溶血现象,其毒力势必高于 MJ-1 株。用 MJ-1 作为活疫苗注射免疫鲫,对强毒株的攻击显示一定的保护作用,这提示 ECPase⁻ 缺失株并没有改变其菌体表面特性, MJ-1 的表面抗原仍然存在,能刺激机体产生针对细菌菌体抗原的抗体,使鲫对强毒的攻击有一定的保护。此种主要毒力因子缺失可作为研究鱼类的疫苗的新手段。

参考文献:

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
- [2] Pemberton J M, Kicld S P, Schmidt R. Secreted Enzymes of *Aeromonas*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 15: 1-10.
- [3] 凌红丽, 陆承平, 陈怀青. 6株嗜水气单胞菌的毒力因子及其对小白鼠的致病性[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(3): 255-257.
- [4] 储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶对鲫的致病性[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(2): 80-84.
- [5] 管征, 颜望明. 接合性转座子 *Tn916* 的研究进展[J]. 微生物学通报, 1994, 21(2): 111-116.
- [6] 李焕荣, 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶 ECPase54 的纯化及特性分析[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 88-94.
- [7] Leung K Y, Yeap I V, Lam T J, et al. Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South-East Asia[J]. J Fish Dis, 1994, 18: 511-518.
- [8] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent points[J]. Am J Hyg, 1938, 27: 493-497.
- [9] Roberson B S. Bacterial agglutination[A]. Stolen J S, Fletcher T C, Anderson D P, et al: Techniques in Fish Immunology[M]. Fair Havan N J: SOS Publications, 1990. 81-86.
- [10] Eills A E. General principles of fish vaccination[A]. Eills A E: Fish vaccination[M]. San Diego: Academic Press, 1988. 1-19.
- [11] Ysabel S, Alicia E T, Juan L, et al. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish[J]. Infection and Immunity, 1998, 56: 3258-3293.
- [12] Leung K Y, Stevenson R M W. *Tn5*-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish[J]. Infection and Immunity, 1988, 56: 2639-2644.
- [13] Octavio R, Juan A, Carmen P, et al. Molecular cloning and characterization of an extracellular protease gene from *Aeromonas hydrophila*[J]. J Bacteriol, 1990, 172: 3509-3908.