

鳗源迟缓爱德华氏菌菌蜕的构建及制备条件优化

李宁求, 余露军, 付小哲, 刘礼辉, 林 强, 常藕琴,
石存斌, 黄志斌, 吴淑勤*

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔药创制重点实验室,
广东省免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380)

摘要: 菌蜕具有完整细菌表面抗原结构, 可诱导机体的体液和细胞免疫应答, 成为疫苗制备的候选之一, 为了探讨鳗鲡迟缓爱德华氏菌菌蜕疫苗的可行性, 实验采用基因重组技术构建了噬菌体 PhiX174 裂解酶基因(Lysis E)的温控表达载体, 转化迟缓爱德华氏菌, 成功制备其菌蜕, 并对菌蜕形态、溶菌动力学、裂解效率以及制备条件等进行了研究。结果表明, 细菌菌蜕表面形成溶菌孔道, 细胞因内容物流失而发生明显的皱缩; 构建的迟缓爱德华氏菌诱导后 1 h 开始裂解, 5 h 后裂解基本完成, 裂解效率为 99.99%, 冷冻干燥后重悬涂布平板, 未检出活菌, 电镜观察表明冻干前后细胞形态未见明显变化; 构建的迟缓爱德华氏菌分别在 OD₆₀₀ 值为 0.4 和 0.6 进行诱导, 其裂解过程和裂解效率没有明显区别; 分别用 LB、BHI、NB 3 种培养基进行比较研究, 其中 LB 培养基制备的菌蜕细胞较完整、裂解完全, 是制备迟缓爱德华氏菌菌蜕最优培养基。本研究成功构建了鳗源迟缓爱德华氏菌菌蜕, 并对其制备条件进行了优化, 为鳗鲡爱德华氏菌病疫苗开发奠定了基础。

关键词: 鳗鲡; 迟缓爱德华氏菌; 菌蜕; 条件优化

中图分类号: Q 784; S 917.4

文献标志码: A

爱德华氏菌病是目前全球水产养殖业最具威胁的疾病之一, 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*) 是其主要病原^[1], 同时该菌还是一种重要的人兽共患病的病原, 可引起人的脑膜炎、肝脓肿、蜂窝组织炎、骨髓炎和败血症等^[2]。迟缓爱德华氏菌是一种兼性胞内寄生的革兰氏阴性杆菌, 无荚膜, 不形成芽孢, 周生鞭毛、运动, 兼性厌氧。由于其胞内寄生的特点, 使得天然免疫、抗体免疫应答和体液抗菌物质等难以对其起作用, 导致以体液免疫应答为主的迟缓爱德华氏菌灭活疫苗和亚单位疫苗免疫保护效果不理想。机体抗胞内菌感染主要依赖细胞免疫, 即通过效应性 T 细胞(包括 CD₄⁺Th1 细胞和 CD₈⁺Tc 细胞)发挥作用, 因此, 研制出能引发细胞免疫应答的新型疫苗是鳗鲡爱德华氏菌病

疫苗开发的主要方向之一。

菌蜕(bacterial ghosts)是革兰氏阴性菌被噬菌体 PhiX174 裂解酶基因 E 裂解形成的不含任何胞内物质的细菌空壳。20 世纪 80 年代奥地利学者 Witte 等^[3]率先制备了大肠杆菌菌蜕, 随后国内外学者成功研制出多种病原菌菌蜕^[4]。这种基因灭活过程不会改变细菌本身内外膜结构, 因而菌蜕具有完整的细菌表面抗原结构, 它可以在不添加佐剂的情况下产生较强免疫反应, 同时, 由于菌蜕表面存在着鞭毛和纤毛等结构, 易于在特定组织和细胞中黏附, 更容易被巨噬细胞和树突状细胞识别, 增加了与抗原递呈细胞接触的机会, 使机体既能产生体液免疫反应也能产生细胞免疫反应^[5]。为了探讨鳗鲡迟缓爱德华氏菌菌蜕疫苗的可行性,

收稿日期: 2012-03-31

修回日期: 2012-08-28

资助项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD25B02); 国家自然科学基金项目(31202032); 广东省自然科学基金项目(7004728)

通讯作者: 吴淑勤, E-mail: wushuqin001@21cn.com

本研究将构建的含有裂解酶基因的菌蛻温控载体导入鳗鲷迟缓爱德华氏菌致病株, 制备迟缓爱德华氏菌菌蛻, 研究其裂解效率、制备条件, 为进一步研发有效的菌蛻疫苗奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与质粒

迟缓爱德华氏菌菌株 AnGH080301^[6]、大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。大肠杆菌 PhiX174 噬菌体 DNA 从纽英兰公司(New England BioLabs Inc., USA)购买。克隆载体 pMD18-T Vector 为 TaKaRa 公司产品。原核表达质粒 pBV220 由本实验室保存。

1.2 PhiX174 裂解酶基因克隆

参照 GenBank 已登录的大肠杆菌 PhiX174 噬菌体裂解酶基因(Lysis E)序列设计引物: Phi-F: 5'-ATGGTACGCTGGACTTTGTG-3'和 Phi-R: 5'-ACATTACATCACTCCTTCCG-3', 由上海生工生物工程技术有限公司合成。以大肠杆菌 PhiX174 基因组 DNA 为模板, 用 Phi-F 和 Phi-R 为引物进行 PCR 扩增, 50 μ L 反应体系含有: 10 \times PCR Buffer 5 μ L, 10 mmol/L dNTP(each) 1 μ L, Phi-F(20 μ mol/L)2 μ L, Phi-R(20 μ mol/L)2 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L)0.5 μ L, DNA 1 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸, 7 min。取 5 μ L PCR 产物, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

PCR 产物经 DNA Gel Extraction Kit 纯化后, 与 pMD18-T Vector 用 T₄ DNA 连接酶连接过夜。转化大肠杆菌 DH5 α , 蓝白斑筛选重组子。由上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.3 菌蛻表达质粒 pBVLysis E 构建

设计并合成了 1 对引物 gE-F: 5'GCGAATTCATGGTACGCTG3'和 gE-R: 5'GCGGATCCTTATCACTCCTTC 3' (下划线示 *EcoR* I、*Bam*H I 酶切位点), 通过 PCR 对 Lysis E 基因两端进行改造, 用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 分别酶切载体 pBV220 和改造过的 Lysis E 基因, 纯化后用 T₄ DNA 连接酶连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 培养后提取质粒进行酶切鉴定。

1.4 大肠杆菌菌蛻制备及裂解效率的测定

将鉴定为阳性的大肠杆菌 DH5 α (pBVLysis E)菌株接种于 3 mL(Amp 终浓度 50 μ g/mL)的 LB 液

体培养基, 30 $^{\circ}$ C 恒温摇床, 200 r/min 培养过夜。次日将过夜培养液按 1 : 100 接种于 100 mL(Amp 终浓度 50 μ g/mL)的 LB 液体培养基, 200 r/min 摇床培养至 OD₆₀₀=0.4~0.5, 迅速升温至 42 $^{\circ}$ C 进行诱导, 诱导后 1 h 内每隔 15 分钟取样, 1 h 后每隔 20 分钟取样, 测 OD₆₀₀ 的吸光值, 同时用不含 pBVLysis E 质粒的大肠杆菌 DH5 α 作为对照。分别取诱导前、诱导后的菌液 100 μ L, 适当稀释后涂布于 LB(Amp 终浓度 50 μ g/mL)平板, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 12 h, 计数活菌数(CFU)。裂解效率(%)=(1-裂解终止时 CFU /诱导开始时 CFU) \times 100, 每个样做 5 个平行, 取平均值。

1.5 迟缓爱德华氏菌菌蛻制备及裂解效率测定

参照吴海珍等^[7]方法制备迟缓爱德华氏菌 AnGH080301 电击感受态细胞, 向感受态细胞中加入重组质粒 pBVLysis E 2 μ L(100 ng/ μ L), 进行电击转化(电击参数为 25 μ F, 200, 1.8 kV), 将电击细胞转入 1.5 mL 的离心管中, 28 $^{\circ}$ C 复苏 2 h, 取 100 μ L 菌液连续 10 倍倍比稀释, 涂布培养于 BHI(Amp 终浓度 50 μ g/mL)平板, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h, 筛选阳性克隆, 计数转化子并计算电转化效率(转化子/ μ g DNA)。将筛选得到的迟缓爱德华氏菌 AnGH-080301(pBVLysis E)接种于 4 mL BHI(Amp 终浓度 50 μ g/mL)培养基中, 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养, 次日按 1 : 100 转接到 100 mL BHI(Amp 终浓度 50 μ g/mL)中, 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀=0.4, 迅速升温至 42 $^{\circ}$ C 进行诱导, 直至 OD₆₀₀ 值趋于稳定, 裂解终止。裂解效率测定同 1.4。

1.6 迟缓爱德华氏菌菌蛻制备条件优化

不同诱导起点对菌蛻生产的影响 将迟缓爱德华氏菌 AnGH080301(pBVLysis E)接种于 4 mL LB(Amp 终浓度 50 μ g/mL)培养基中, 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜, 次日按 1 : 100 转接到 2 瓶 100 mL LB(Amp 终浓度 50 μ g/mL)中, 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养, 菌液 OD₆₀₀ 值分别至 0.4 和 0.6 左右时, 迅速升温至 42 $^{\circ}$ C 进行诱导, 每隔 30 分钟取样, 测菌液 OD₆₀₀ 吸光值, 直到菌株吸光值趋于平稳为止, 裂解效率按 1.4 中方法进行。

不同培养基对菌蛻生产的影响 将迟缓爱德华氏菌 AnGH080301(pBVLysis E)分别接种于 LB、BHI、营养肉汤(NB)3 种培养基中(Amp 终浓度均为 50 μ g/mL), 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养, 次日按 1 : 100 转接到 100 mL 相应的 AMP 抗性培养基

中, 28 °C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 值为 0.4 左右, 迅速升温至 42 °C 进行诱导, 每隔 30 分钟取样, 测菌液 OD₆₀₀ 吸光值, 直到吸光值趋于平稳, 裂解效率按 1.4 中方法进行。

1.7 电镜观察

分别将裂解后大肠杆菌、迟缓爱德华氏菌菌蛻细胞 4 000 × g、4 °C 离心 15 min, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 用 2.5% 戊二醛 4 °C 固定 24 h 以上, 经多步乙醇脱水, 丙酮脱水等步骤处理后用扫描电镜进行观察, 同时采集大肠杆菌、迟缓爱德华氏菌作为对照。

2 结果

2.1 裂解酶基因克隆及菌蛻表达质粒构建

以 PhiX174 噬菌体 DNA 为模板, PCR 扩增出一条与目的片段大小相符的 DNA 片段(图 1), 克隆至 pMD18-T 载体, 测序结果显示目的基因大小 276 bp, 经 Blast 比对分析, 序列与 GenBank 登录的大肠杆菌 PhiX174 噬菌体裂解酶基因序列一致。将改造后的 Lysis E 基因克隆至原核表达载体 pBV220 中, 构建重组质粒, 经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切鉴定及测序分析, 成功构建出含噬菌体 PhiX174 裂解酶基因 Lysis E 的重组质粒, 命名为 pBVLysis E(图 2)。

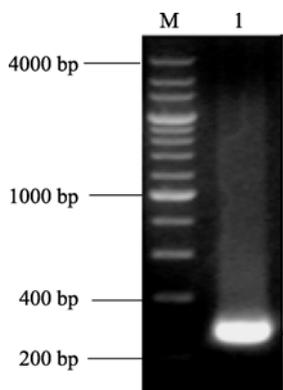


图 1 Phi X 174 噬菌体 Lysis E 基因的 PCR 扩增
M. DL200 分子量标记; 1. Lysis E 基因扩增产物。

Fig. 1 PCR amplification of Lysis E gene of Phi X 174
M. DL200 bp DNA marker; 1. product of Lysis E gene.

2.2 大肠杆菌 DH5α 菌蛻构建及溶菌动力学

含 pBVLysis E 质粒的大肠杆菌 DH5α 经 42 °C 热诱导, 30 min 时 OD₆₀₀ 开始下降, 表明细菌开始裂解, 3 h 后 OD₆₀₀ 趋于平稳, 细菌裂解基本完成(图 3)。扫描电镜显示, 裂解后的大肠杆菌菌蛻保

持基本细胞形态, 细胞表面因为细胞内容物流失而发生明显的皱缩, 并能看到菌蛻细胞上的溶菌孔道, 溶菌孔道总是位于细胞两极(图 4, 箭头所示为溶菌孔)。涂布菌落计数显示, 大肠杆菌活菌浓度从诱导前的 8.81×10⁹ CFU/mL 下降至诱导后的 2.5×10⁴ CFU/mL, 裂解效率为 99.999 7%。结果说明, 构建的 pBVLysis E 质粒能够有效表达大肠杆菌噬菌体裂解酶基因, 且能有效诱导大肠杆菌裂解, 可以尝试用于迟缓爱德华氏菌菌蛻的构建。

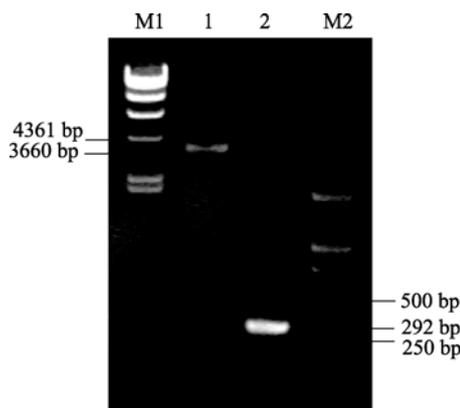


图 2 重组子 pBVLysis E 酶切鉴定

M1. λ-*Hind* III digest 分子量标记; M2. DL2000 分子量标记;
1. *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切重组质粒; 2. Lysis E 基因。

Fig. 2 The restriction mapping analysis of the recombinant plasmids pBVLysis E

M1 λ-*Hind* III digest marker; M2. DL2000 marker;
1: pBVLysisE/ *Eco*R I and *Bam*H I ; 2. Lysis E gene.

2.3 迟缓爱德华氏菌 AnGH080301 菌蛻构建及溶菌动力学

质粒 pBVLysis E 转化迟缓爱德华氏菌, 转化效率为 3.27×10⁵ 转化子/μg DNA。转化 pBVLysis E 质粒的迟缓爱德华氏菌 AnGH080301 经 42 °C 热诱导, 1 h 开始 OD₆₀₀ 下降, 细菌开始裂解, 5 h 后 OD₆₀₀ 趋于平稳, 细菌裂解基本完成(图 5)。扫描电镜显示, 迟缓爱德华氏菌已裂解形成菌蛻, 与正常的细菌相比, 菌蛻细胞由于内容物的流失而明显皱缩变形, 菌蛻细胞的中部可见明显的裂解孔道, 部分细菌甚至发生剧烈裂解而崩塌(图 6, 箭头所示崩塌位置)。涂布菌落计数显示, 迟缓爱德华氏菌活菌浓度从诱导前的 4.69×10⁹ CFU/mL 下降至诱导后的 5.7×10⁴ CFU/mL, 裂解效率为 99.99%。冻干后菌蛻细胞涂布平板, 未检出活菌, 扫描电镜显示冻干前后细胞形态未见明显变化(图 7)。

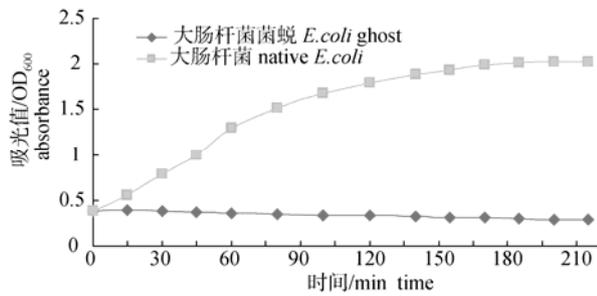


图 3 42 °C 诱导后大肠杆菌 DH5α(pBV Lysis E) 生长及裂解曲线

E. coli ghost: 含裂解质粒 pBV Lysis E 的大肠杆菌 DH5α; native *E. coli*: 大肠杆菌 DH5α。

Fig. 3 Growth and lysis curves of *E. coli* DH5α(pBV Lysis E) by temperature induction of gene E expression

At time zero, the cultures were shifted from 28 °C to 42 °C. *E. coli* ghost: *E. coli* DH5α (pBV Lysis E); native *E. coli*: native *E. coli*.

2.4 迟缓爱德华氏菌菌蛻制备条件优化

不同诱导起点对菌蛻产生的影响 分别将迟缓爱德华氏菌 AnGH080301(pBV Lysis) 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4 和 0.6 时进行诱导表达, 溶菌动力学实验结果显示, OD₆₀₀ 为 0.6 的培养物诱导 2 h 后, 其吸光值开始下降, 较 OD₆₀₀ 为 0.4 的延迟 30 min, 而其裂解剧烈程度和最终的裂解效率均没有明显差别, 诱导 24 h 后涂板均未检出活菌(图 8)。

不同培养基对菌蛻产生的影响 分别采用

BHI、NB、LB 3 种培养基中制备迟缓爱德华氏菌菌蛻, 在相同条件下诱导表达, 菌蛻裂解程度和裂解时间存在明显差别(图 9), 在 BHI 中诱导 30 min 后吸光值开始急速下降, 2 h 后下降速度减慢, 5 h 后基本趋于平稳; 在 NB 中诱导 1 h 后吸光值开始缓慢下降, 10 h 后降至 0.2 左右; 在 LB 中诱导 1.5 h 后开始缓慢下降, 7 h 后降至 0.2 左右。迟缓爱德华氏菌重组菌株在 BHI、NB、LB 3 种培养基中裂解 8 h 后, 活菌数分别下降至 0、2.9×10⁵、6.5×10⁴ CFU/mL, 裂解效率分别为 100%、99.99%、99.999 9%。诱导 24 h 后分别取 100 μL 菌液稀释 10 倍涂布于 LB(含 AMP 50 μg/mL), BHI 和 LB 平板培养的菌液未检出活菌, NB 培养的菌液有少量活菌存在 (2×10² CFU/mL)。扫描电镜结果显示, BHI 培养基中菌蛻裂解孔道较大(约 500 nm), 多出现在菌蛻细胞中央部位, 细胞甚至完全裂开, 细胞碎片较多; 而 LB、NB 培养基培养的菌蛻细胞则比较完整, 裂解孔道较小(100 nm 左右), 多出现在细胞两极, 其中 LB 培养基中的细胞塌陷更明显(图 10)。综合以上结果, 3 种培养基中裂解效率: BHI>LB>NB, 裂解剧烈程度: BHI>NB>LB, 细胞完整性: LB=NB>BHI, 因此, 以 LB 作为迟缓爱德华氏菌菌蛻制备的培养基既能达到较高的裂解效率, 又具有较好的细胞完整性, 是制备迟缓爱德华氏菌菌蛻的最优培养基。

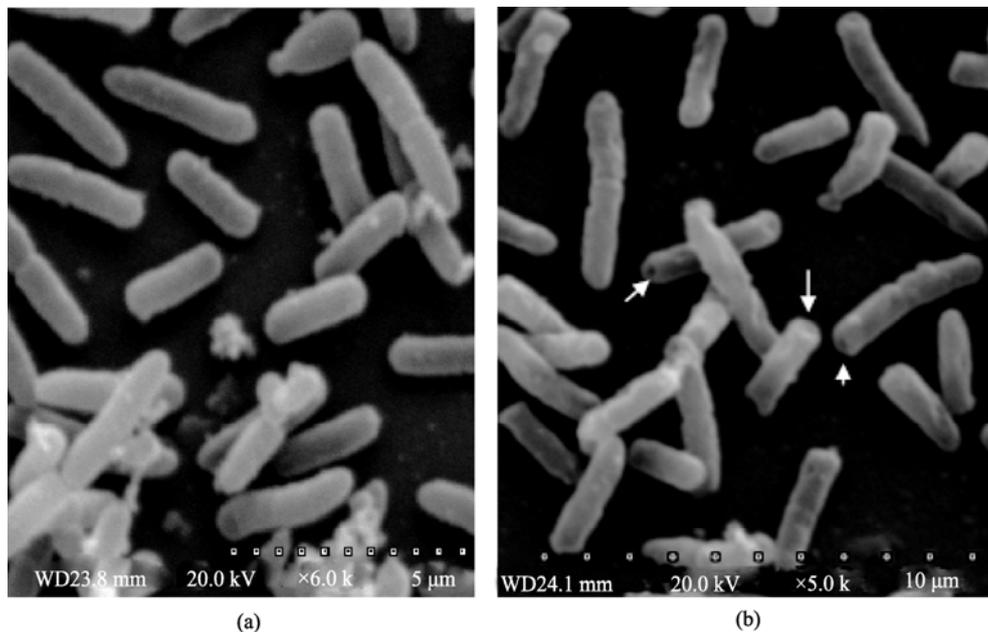


图 4 大肠杆菌 DH5α 菌蛻扫描电镜观察

(a) 正常大肠杆菌 DH5α; (b) 大肠杆菌 DH5α 菌蛻, 箭头所示为裂解孔道。

Fig. 4 Evaluation of *E. coli*(DH5α) ghosts by SEM

(a) Native *E.coli*(DH5 α); (b) ghosts of *E.coli*(DH5 α), Arrow shows the trans-membrane lysis tunnel.

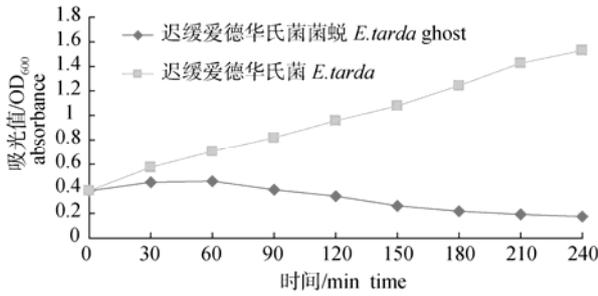


图 5 42 °C 诱导后迟缓爱德华氏菌 AnGH080301(pBVLysis E) 生长及裂解曲线
E.tarda ghost: 含裂解质粒 pBVLysis E 的迟缓爱德华氏菌 AnGH080301; *E.tarda*: 正常迟缓爱德华氏菌 AnGH080301。

Fig. 5 Growth and lysis curves of *E.tarda* (pBVLysis E) by temperature induction of gene E expression
 At time zero, the cultures were shifted from 28 °C to 42 °C. *E.tarda* ghost: *E.tarda*(pBVLysis E) ghost; *E.tarda*: native *E.tarda*.

3 讨论

由于菌蛻在制备过程中保留了完整的表面抗原结构, 具有与活细菌相媲美的免疫原性, 能引发机体强烈细胞免疫^[5,8]及体液免疫应答^[9-10], 成为迟缓爱德华氏菌等胞内寄生菌疫苗构建重要选择。已有学者构建了从牙鲆^[11]、大菱鲆^[12-13]等分离的迟缓爱德华氏菌菌蛻, 本研究成功构建了鳗源迟缓爱德华氏菌菌蛻, 并对其制备条件进行了优化, 为鳗鲡爱德华氏菌病疫苗开发奠定了基础。

3.1 表达系统及裂解效率

菌蛻制备是通过控制噬菌体 Lysis E 基因的表达来实现, 因此调控元件的选择直接影响菌蛻的裂解效率, 本研究采用对温度敏感的 λ PR/pL-cl857 表达系统构建了 Lysis E 温控表达载体, 成功制备

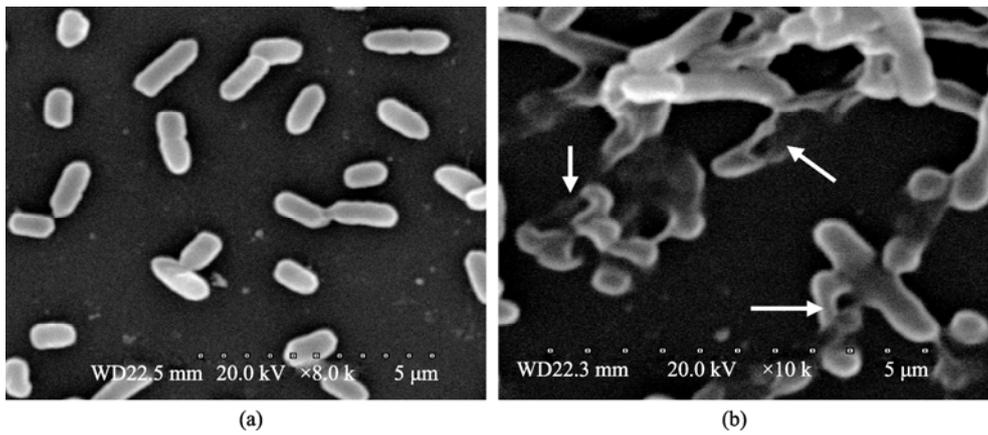


图 6 迟缓爱德华氏菌菌蛻扫描电镜观察
 (a) 正常迟缓爱德华氏菌; (b) 爱德华氏菌菌蛻, 箭头所示为细菌崩塌位置。

Fig. 6 Evaluation of *E.tarda* ghosts by SEM
 (a) Native *E.tarda*; (b) *E.tarda* ghosts, Arrow shows the trans-membrane lysis tunnel.

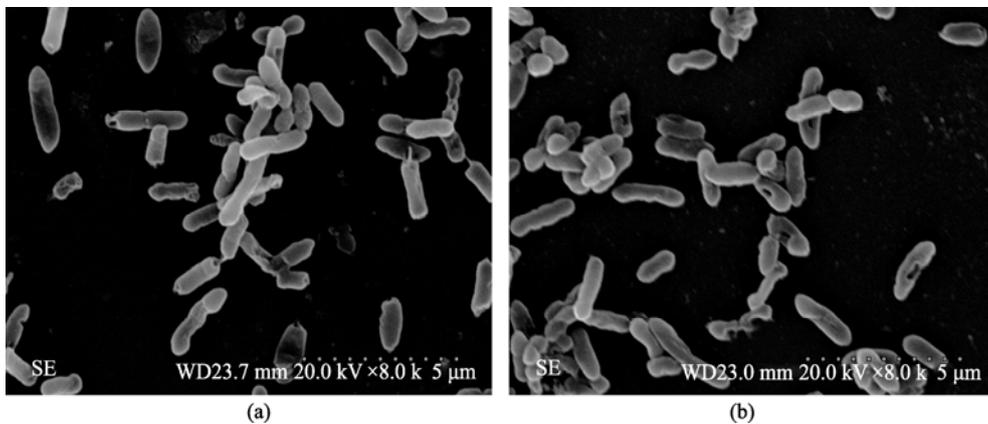


图 7 *E.tarda* 菌蛻冻干前后扫描电镜观察比较

(a) 冻干前 *E.tarda* 菌蛻; (b) 冻干后 *E.tarda* 菌蛻, 箭头所示为裂解孔道。

Fig. 7 SEM of *E.tarda* ghosts and *E.tarda* ghosts by lyophilization

(a) *E.tarda* ghost; (b) *E.tarda* ghosts by lyophilization, Arrow shows the trans-membrane lysis tunnel.

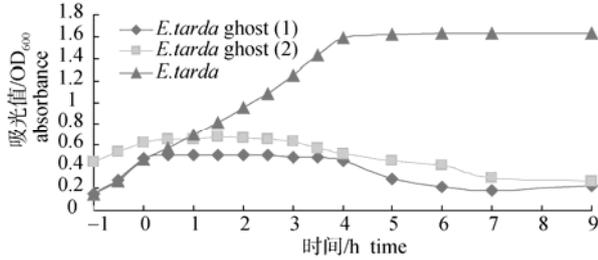


图 8 不同诱导起点下迟缓爱德华氏菌 AnGH080301 菌蛻生长及裂解曲线

E.tarda ghost(1)、*E.tarda* ghost(2)分别表示细菌生长至 OD₆₀₀0.4 和 0.6 时进行诱导; *E.tarda* 表示迟缓爱德华氏菌 AnGH080301 (pBV Lysis E)在 28 °C 条件下生长曲线。

Fig. 8 Growth and lysis curves of *E.tarda* AnGH080301 (pBV Lysis E) by temperature induction of gene E expression at different growth points

At time zero, the cultures were shifted from 28 °C to 42 °C except *E.tarda*. *E.tarda* ghost(1), *E.tarda* ghost(2) represent *E.tarda* AnGH080301 (pBV Lysis E)induction at OD₆₀₀0.4 or 0.6; *E.tarda* represents AnGH080301(pBV Lysis E)growth in LB medium at 28 °C.

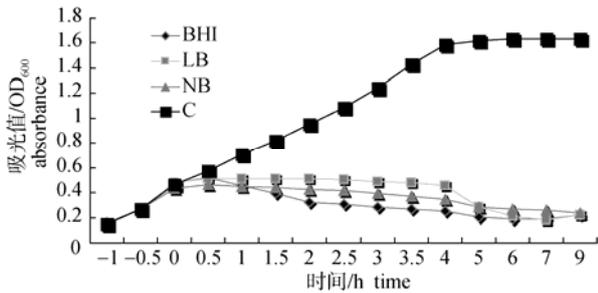


图 9 迟缓爱德华氏菌 AnGH080301(pBV Lysis E)菌蛻在不同培养基中的生长及裂解曲线

BHI、LB、NB 分别表示迟缓爱德华氏菌 AnGH080301(pBV Lysis E)在 BHI、LB、NB 培养基中生长及裂解曲线; C 表示迟缓爱德华氏菌 AnGH080301(pBV Lysis E)在 LB 培养基中 28 °C 培养作对照。

Fig. 9 Growth and lysis curves of *E.tarda* AnGH080301 (pBV Lysis E) in three different medium

At time zero, the cultures were shifted from 28 °C to 42 °C except C. BHI, LB, NB represent *E.tarda* AnGH080301(pBV Lysis E)growth in BHI, LB, NB media respectively; C represents AnGH080301 (pBV Lysis E)growth in LB medium at 28 °C as a control.

出大肠杆菌及迟缓爱德华氏菌菌蛻, 诱导 3 h 大肠杆菌裂解效率达 99.999 7%, 诱导 5 h 迟缓爱德华氏菌裂解效率为 99.99%, 其裂解效率与其他研究者的结果类似^[11,14]。相对于化学物质诱导表达系统, 本研究构建的热敏感表达系统具有无毒性、对细菌表面抗原破坏小等优点更适合于菌蛻的制备。

3.2 制备条件优化

诱导起始时间直接影响菌蛻最终产量, 一般来说诱导起始时间越晚产量越高。但 Lubitz 等^[15]研究发现细菌活性对细菌的裂解有重要影响, 活性不强的细菌和未正常分裂细菌不能正常裂解。Witte 等^[16]研究也指出, 蛋白 E 融入大肠杆菌细胞后依靠细胞的质子动力势产生裂解作用。本研究结果表明, 构建的迟缓爱德华氏菌分别在 OD₆₀₀ 为 0.4 和 0.6 进行诱导, 其裂解过程和裂解效率没有明显区别。因此, 在细菌对数生长期, 适当增大诱导时细菌浓度, 对菌蛻的规模化生产具有实际意义。同时, 本研究比较了 LB、BHI、NB 3 种培养基对迟缓爱德华氏菌菌蛻生成的影响, 结果表明不同培养基对菌蛻裂解效率、裂解完成时间、裂解程度和裂解孔道大小均存在明显差异。在 BHI 培养基中裂解孔道最大, 甚至完全裂开, 8 h 后完全灭活, 裂解效率最高, 但细胞碎片较多; 而在 LB、NB 培养基中裂解孔道较小, 细胞较完整, 但是诱导 24 h 后, NB 中仍能检测到活菌, LB 中则未检出活菌, 导致这种差别的原因可能是培养基中盐离子浓度及营养成分存在差异。已有报道表明, 培养基的成分和培养环境影响菌蛻的产生, 如增加培养基中 Mg²⁺浓度可以增大菌蛻的裂解孔道^[17], 霍乱弧菌菌蛻只有在 AKI 培养基中 30 °C 培养时才表达霍乱弧菌菌毛蛋白(TCP), 而在 BHI 中 37 °C 培养时则检测不到 TCP 蛋白的表达^[18]。综上所述, LB 培养基制备的菌蛻细胞较完整、裂解完全, 是制备迟缓爱德华氏菌菌蛻的最优培养基。但具体是何种成分对菌蛻形成产生影响及其作用机理、表面抗原成分是否存在区别有待进一步的研究。

3.3 安全性

菌蛻作为一种调控基因表达进行失活的疫苗其安全性是大家关注的焦点。理论上来说, 菌蛻形成时细菌 DNA 已大量流失, 因此作为疫苗进入动物体内后基因水平转移的风险较小, 比传统灭活疫苗(含细菌全部的 DNA)具有更高的生物安全性。虽然实验构建的载体在大肠杆菌中获得了较高的裂解效率, 但菌蛻裂解效率仍未达 100%, 且实验还发现在大肠杆菌裂解末期会有变异株产生, 能够耐受 E 蛋白介导的裂解。本研究构建的迟缓爱德华氏菌菌蛻诱导 24 h 后, 仍没有变异株产生, 这

可能是由于迟缓爱德华氏菌不是噬菌体 PhiX174 天然宿主的原因, Panthel 等^[19]也得到类似的结果。本研究构建的迟缓爱德华氏菌在诱导 1 h 后 OD₆₀₀ 值才开始下降, 较大肠杆菌(30 min 开始下降)迟, 表明

质粒裂解能力在迟缓爱德华氏菌中比在大肠杆菌中弱, 这可能是由于野生型细菌细胞壁对裂解酶蛋白 E 敏感性较低缘故。虽然野生型迟缓爱

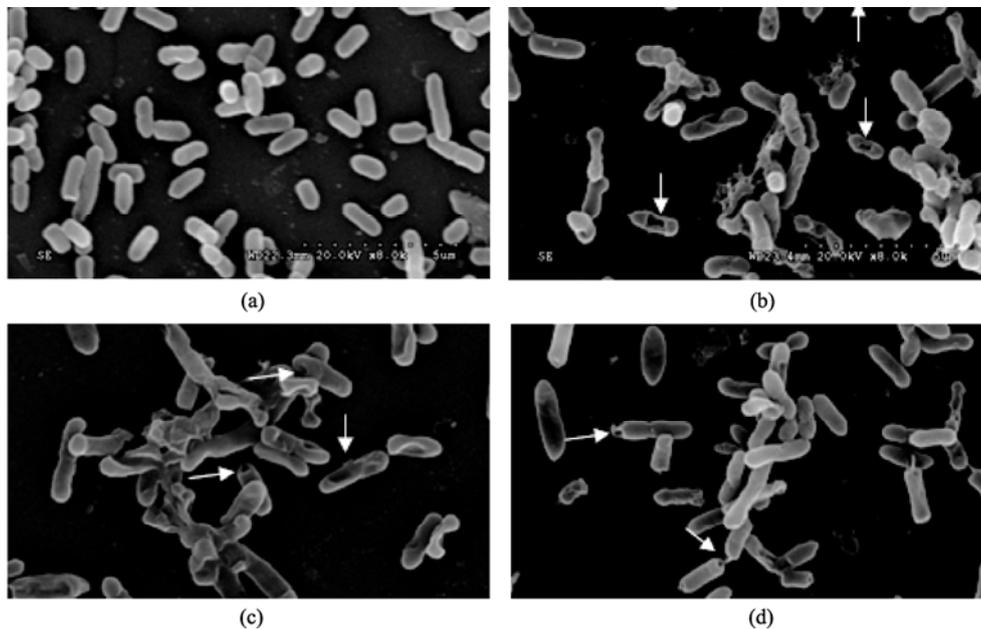


图 10 不同培养基制备的迟缓爱德华氏菌 AnGH080301 菌壳扫描电镜观察

(a) 正常 *E.tarda* AnGH080301; (b) *E.tarda* AnGH080301(pBVLysis E) 在 BHI 培养基中制备的菌壳; (c) *E.tarda* AnGH080301(pBVLysis E) 在 LB 培养基中制备的菌壳; (d) *E.tarda* AnGH080301(pBVLysis E) 在 NB 培养基中制备的菌壳。

Fig. 10 Evaluation of *E.tarda* AnGH080301 and *E.tarda* AnGH080301 ghosts growth in different media by SEM

Native *E.tarda* AnGH080301; (b) *E.tarda* AnGH080301(pBVLysis) ghosts growth in BHI medium; (c) *E.tarda* AnGH080301(pBVLysis) ghosts growth in LB medium; (d) *E.tarda* AnGH080301(pBVLysis) ghosts growth in NB medium.

德华氏菌开始裂解时间较大肠杆菌晚, 裂解时间较长, 但其裂解效率并未减弱, 且由于不会产生细菌变异株, 因而具有更好的安全性。研究结果表明, 将诱导后的迟缓爱德华氏菌菌壳进行冷冻干燥后重悬, 涂布平板没有检测到活菌。说明冻干过程可将菌壳生产中未被裂解的少数活菌完全灭活, 对此结果有两种解释: 一是认为裂解之后菌壳细胞中残留的活菌数较少, 在冻干过程中没有添加任何保护剂, 这些残留的少数活菌在冻干过程中死亡^[20]; 二是认为残留活菌细胞膜中插入了裂解酶蛋白 E 而脆性更强, 因此在冻干过程中细胞膜碎裂, 从而达到完全灭活的效果^[17]。扫描电镜结果显示, 冻干前后迟缓爱德华氏菌菌壳形成没有产生明显变化, 冻干过程可使菌壳完全灭活, 又方便保存, 延长保存时间。

参考文献:

- [1] Mohanty B R, Sahoo P K. Edwardsiellosis in fish: a brief review[J]. Journal of Biosciences, 2007, 32(7): 1331–1344.
- [2] Bockemühl J, Pan-Urai R, Burkhardt F. *Edwardsiella tarda* associated with human disease[J]. Pathologia et Microbiologia, 1971, 37(5): 393–401.
- [3] Witte A, Lubitz W, Bakker E P. Proton-motive-force-dependent step in the pathway to lysis of *Escherichia coli* induced by bacteriophage phi X174 gene E product[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(4): 1750–1752.
- [4] 密金玲, 聂奎. 细菌菌壳疫苗的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(5): 504–506, 511.
- [5] Haslberger A G, Kohl G, Felnerova D, et al. Activation, stimulation and uptake of bacterial ghosts in antigen presenting cells[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 83(1–2): 57–66.
- [6] 余露军, 李宁求, 刘礼辉, 等. 日本鳎混合感染迟缓爱德华氏菌与创伤弧菌的分离与鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(8): 799–803.

- [7] 吴海珍, 张惠展, 梁娜, 等. 鳗弧菌 *Vibrio anguillarum* MVM425sh 高效电转化条件的优化[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(8): 600–602, 608.
- [8] Mader H J, Szostak M P, Hensel A, *et al.* Endotoxicity does not limit the use of bacterial ghosts as candidate vaccines[J]. *Vaccine*, 1997, 15(2): 195–202.
- [9] Marchart J, Rehagen M, Dropmann G, *et al.* Protective immunity against pasteurellosis in cattle, induced by *Pasteurella haemolytica* ghosts[J]. *Vaccine*, 2003, 21(13): 1415–1422.
- [10] Hensel A, Huter V, Katinger A, *et al.* Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state[J]. *Vaccine*, 2000, 18(26): 2945–2955.
- [11] Kwon S R, Nam Y K, Kim S K, *et al.* Generation of *Edwardsiella tarda* ghosts by bacteriophage PhiX174 lysis gene E[J]. *Aquaculture*, 2005, 250(1): 16–21.
- [12] Castro N, Toranzo A E, Nunez S, *et al.* Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 208–212.
- [13] 牟为, 管玲玉, 王启要, 等. 迟缓爱德华氏菌菌蛻系统的构建[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(3): 1–5.
- [14] 储卫华, 庄禧懿, 陆承平. 嗜水气单胞菌菌蛻的制备及其对银鲫的口服免疫[J]. 微生物学报, 2008, 48(2): 202–206.
- [15] Lubitz W, Halfmann G, Plapp R. Lysis of *Escherichia coli* after infection with phiX174 depends on the regulation of the cellular autolytic system[J]. *Journal of General Microbiology*, 1984, 130(5): 1079–1087.
- [16] Witte A, Wanner G, Sulzner M, *et al.* Dynamics of PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*[J]. *Archives of Microbiology*, 1992, 157(4): 381–388.
- [17] Jalava K, Hensel A, Szostak M, *et al.* Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications[J]. *Journal of Controlled Release*, 2002, 85(1): 17–25.
- [18] Eko F O, Schukovskaya T, Lotzmanova E Y, *et al.* Evaluation of the protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghost (VCG) candidate vaccines in rabbits[J]. *Vaccine*, 2003, 21(25): 3663–3674.
- [19] Panthel K, Jechlinger W, Matis A, *et al.* Generation of *Helicobacter pylori* ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(1): 109–116.
- [20] 李小妹, 马跃, 李安兴, 等. 禽致病性大肠杆菌(APEC)菌蛻的制备研究[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(6): 423–427.

Construction of *Edwardsiella tarda* ghosts from eel and their optimization of preparation conditions

LI Ning-qiu, YU Lu-jun, FU Xiao-zhe, LIU Li-hui, LIN Qiang,
CHANG Ou-qin, SHI Cun-bin, HUANG Zhi-bin, WU Shu-qin*

(Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Edwardsiellosis caused by *Edwardsiella tarda* is one of the most serious diseases in the eel culture industry. Bacterial ghosts, which have native surface antigenic structures and can induce humoral and cellular immune response, have become candidate of vaccine development. To explore the feasibility of *E. tarda* ghost vaccine in eel, *E. tarda* ghosts were generated by the thermal controlled expression of the PhiX174 lysis gene E in present study. At the same time the morphology, lysis kinetics, lysis efficiency and preparation conditions were also studied. Holes were observed in *Escherichia coli* and *E. tarda* ghosts by scanning electron microscopy and the bacteria become withered due to the loss of bacterial content. The lysis kinetics in *E. tarda* were also compared with those in *E. coli*. Generation of ghosts in the transformants of *E. coli* and *E. tarda* carrying plasmid pBVlysisE was performed successfully by increasing the incubation temperature up to 42°C. Compared to *E. coli*, in which lysis was observed within 30 min and was completed 3 h after induction of E gene expression, onset of *E. tarda* lysis occurred 1 h after temperature elevation and the lysis process was completed 5 h after induction. At the end of the lysis process, the efficiency of ghost induction in non-lyophilized *E. tarda* was 99.99%, as the results of 5 replicate experiments showed. However, no bacterial growth was detected in lyophilized *E. tarda* and there is no obvious difference in bacterial morphology before and after lyophilization. The lysis kinetics and lysis efficiency had no difference between beginning of induction at OD₆₀₀=0.4 and 0.6. Among LB, BHI and NB medium, LB medium is the best for preparation of *E. tarda* because in this medium the ghosts are more integrated and lysed completely. In the study we successfully constructed *E. tarda* ghosts and optimized their preparation conditions, which will provide the foundation for development of vaccine against edwardsiellosis in eel.

Key words: eel; *Edwardsiella tarda*; ghost; optimization of preparation condition

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com