

文章编号:1000-0615(2007)01-0062-06

嗜水气单胞菌感染后牛蛙血清中抗菌物质的初步研究

邹文政, 张俊杰, 鄢庆枇, 纪荣兴

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:用 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的嗜水气单胞菌腹腔注射感染牛蛙, 注射后 7 d 内试验组牛蛙血清抗菌活性都高于对照组, 其中在 3 d、7 d 时存在显著性差异, 峰值出现在感染后第 3 天。收集第 2 批人工感染后 3 d 时牛蛙的血清。该血清经 Sephadex G-25 凝胶柱分离后, 并在波长 280 nm 处测定紫外吸收值, 得到两个吸收峰。以嗜水气单胞菌检测分离物的抗菌活性, 结果表明经诱导的血清抗菌物质主要集中在第 1 个吸收峰。通过对金黄色葡萄球菌等 10 株指示菌抗菌谱的测定, 其对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌等具有明显的抗菌作用; SDS-PAGE 分析显示抗菌蛋白分子量较大。结果说明: 牛蛙被嗜水气单胞菌感染后能很快产生多种抗菌物质, 主要的抗菌物质是分子量比较大的物质, 这些抗菌物质对部分革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌有抗菌作用。

关键词:牛蛙; 嗜水气单胞菌; 抗菌蛋白; 抗菌活性

中图分类号: S 917

文献标识码: A

Studies on antibacterial protein of bullfrog serum infected by *Aeromonas hydrophila*

ZOU Wen-zheng, ZHANG Jun-jie, YAN Qing-pi, JI Rong-xing

(Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: To investigate the antibacterial protein in bullfrog (*Rana catesbeiana*) serum, bullfrogs were injected intraperitoneally with *Aeromonas hydrophila* suspension with a concentration of $1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$. The antibacterial activities of sera from infected bullfrogs in the period of 7 d post-injection were higher than those of control bullfrogs injected i. p. with sterile physiological saline. The serum antibacterial activity of infected bullfrogs peaked at 3 d post-injection and had a significant difference ($P < 0.05$) to the control counterpart at 3 d and 7 d post-injection. Another group of bullfrogs were injected i. p. with *Aeromonas hydrophila*, and the sera were collected 3 d post-injection. The sera were separated by Sephadex G-25 gel filtration. The results of OD_{280} showed that there were 2 main peaks of the fractions collected. The antibacterial activity of serum to *Aeromonas hydrophila* was determined and the results showed that the first peak contained the main antibacterial protein. The antibacterial range of the antibacterial fractions was determined by using 10 strains as indicator, among them, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* were inhibited. Result of SDS-PAGE assay showed high-molecular-weight of the antibacterial

收稿日期: 2006-06-13

项目资助: 福建省自然科学基金 (B0410022)

作者简介: 邹文政 (1975 -), 男, 江西乐安人, 实验师, 硕士研究生, 主要从事水产动物疾病防治研究。Tel: 0592 - 6180522, E-mail: wzhzou@jmu.edu.cn

通讯作者: 鄢庆枇, Tel: 0592 - 6183028, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

protein. The results indicated that bullfrog would produce multi-antibacterial-component soon after being infected by *Aeromonas hydrophila*; the major antibacterial protein had high-molecular-weights and inhibited some Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Key words: *Rana catesbeiana*; *Aeromonas hydrophila*; antibacterial protein; antibacterial activity

牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 是一种两栖类变温动物,它原产于北美洲洛矶山西部一带沼泽地区,是蛙类中仅次于非洲林溪蛙的大型食用蛙。牛蛙具生长迅速、肉质细嫩、丰腴爽口、营养丰富,高蛋白、低脂肪、低胆固醇等优点^[1],美国很早就进行了人工养殖。20 世纪 50 年代末至 60 年代初,我国开始从国外引进牛蛙进行人工养殖,经过几十年努力,我国牛蛙养殖业迅速发展起来。但随着牛蛙养殖规模的不断扩大,疾病发生也越来越频繁^[2-3],严重影响牛蛙养殖业健康可持续发展。嗜水气单胞菌是牛蛙最主要的病原菌之一,其可引起牛蛙红腿病^[4-5],肝脏坏死病^[6],腹水病^[7],“白内障”病^[8]等。目前对嗜水气单胞菌引起的疾病多采用抗生素进行防治,由于抗生素的不当使用容易引起药物残留、耐药性细菌增加和破坏微生态平衡等严重的负面影响^[9],不能满足无公害养殖的需要。因此,开发新型的抗菌药物已迫在眉睫。血清中的抗菌物质在动物抗感染免疫中起着重要作用,近年来,在多种动、植物中发现了抗菌物质,这些抗菌物质以其独特的抗菌机制、广谱的杀菌作用、高效的抗菌活性和靶菌株不易产生耐药性突变等优点成为研究热点^[10]。目前已发现的抗菌物质(包括抗菌肽)广泛存在于细菌、真菌、昆虫、被囊动物、两栖类、甲壳类、鸟类、鱼类、哺乳类乃至人类,以及植物在内的所有生物体中;水生动物的研究主要集中在甲壳纲的蟹、蟹等^[11]。国外对蛙类抗菌蛋白的研究主要集中在蛙类的皮肤^[12-14],国内对其研究较少^[15],尚未见牛蛙血清抗菌物质的研究报道。本文研究嗜水气单胞菌感染对牛蛙血清抗菌活力的影响,并进行了抗菌蛋白的初步分离和抗菌谱测定,以期进一步了解血清抗菌蛋白在牛蛙抗感染免疫中的作用;分离出抗菌蛋白,并研究了其抗菌活性,这不仅有利于了解牛蛙在自然状况下的防御机制,而且对开发新型药物等方面的研究也具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

试验牛蛙购自福建厦门牛蛙养殖场,体重 300 ~ 400 g(属成蛙阶段,但性未完全成熟),健康活泼,无体外伤,暂养于水族箱中。

试验菌 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 分离于患“白内障”病牛蛙^[8]。

其他指示菌 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*), 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*), 粪肥纤维单胞菌 (*Cellulomonas fimi*), 黄色八叠球菌 (*Saricina flava*), 迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*), 普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 购自中科院微生物研究所。Sephadex G-25, Amershan Biosciences 公司出品。

1.2 人工感染后牛蛙血清抗菌活力的变化

牛蛙的人工感染 30 °C 培养 20 h 的嗜水气单胞菌用灭菌生理盐水制成浓度为 1×10^7 mL⁻¹ (1/5 LD₅₀) 的菌悬液。将 50 只牛蛙分成 2 组,每组 25 只。试验组每只蛙腹腔注射 0.2 mL 菌液,对照组每只蛙腹腔注射 0.2 mL 灭菌生理盐水,置水族箱中饲养,试验期间水温 (21 ± 2) °C。

血清收集 注射后 0、1、3、7、11、15、20 d 从试验组和对照组各取 3 只蛙,从心脏采血,置于 4 °C 冰箱过夜以析出血清。

抗菌活性测定 参照鄢庆彬等^[16]方法进行,将嗜水气单胞菌接种在普通营养琼脂斜面上,置 30 °C 的生化培养箱内培养 18 ~ 20 h,用 0.1 mol · L⁻¹、pH 6.4 的磷酸钾盐缓冲液制备菌悬液 ($A_{570} \approx 0.3$)。取 3.0 mL 该菌悬液与 50 μL 待测血清于试管中混匀,测定其在 570 nm 处的吸光度值 (A_0),然后将试管置于 37 °C 水浴 30 min 后测定其吸光度值 (A)。抗菌活力 (U_a) 按下式计

算:

$$U_a = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A}}$$

1.3 牛蛙血清中抗菌蛋白的诱导与收集

采用上述方法对第二批 15 只牛蛙进行人工感染,诱导血清抗菌活性。注射后 3 d 从心脏采血,置于 4 °C 冰箱过夜析出血清,0.22 μm 微孔滤膜过滤后分装于 2 mL 血清瓶中,保存于 -80 °C 低温冰箱中备用。

1.4 血清中抗菌蛋白的分离

将 Sephadex G-25 装入层析柱,0.2 mol · L⁻¹ 的磷酸钠缓冲液(pH 7.2)充分平衡后上样 6 mL 牛蛙血清,用 0.2 mol · L⁻¹ 的磷酸钠缓冲液洗脱,流速为 0.5 mL · min⁻¹,收集洗脱分离液,每管 1 mL,测定其 OD₂₈₀ 值。

1.5 抗菌蛋白的抗菌试验

采用琼脂扩散法(打孔法)^[17]测定分离组分的抗菌活性。即在 45 °C 10% 营养的营养琼脂培养基中加入终浓度为 1 × 10⁵ mL⁻¹ 的嗜水气单胞菌,混合均匀后在每个培养皿(9 cm)中倒入 30 mL,待冷却凝固后放入 4 °C 冰箱中 1 h。然后取出平板用 4.5 mm 打孔器打孔,在每孔中加入 25 μL 分离液,4 °C 冰箱静置 1.5 h 后 30 °C 培养 24 h,测量抑菌圈直径,计算抑菌圈面积。

1.6 抗菌蛋白的抗菌谱试验

采用 1.5 方法测定有抗菌活性的血清组分对 10 株指示菌的抗菌作用。

1.7 抗菌蛋白凝胶电泳

取 10 μL 有抗菌活性的组分进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳。压缩胶电流 10 mA,分离胶电流 18 mA。用银染法染色^[18]。

2 结果

2.1 嗜水气单胞菌感染对血清抗菌活性的影响

注射后牛蛙血清对嗜水气单胞菌的抗菌活性如图 1 所示。感染组牛蛙血清的抗菌活力在注射后 7 d 内都高于对照组,其中在 3 d、7 d 时存在显著性差异,峰值出现在感染后 3 d。这说明注射嗜水气单胞菌在初期能显著增加牛蛙血清的抗菌活力。

2.2 牛蛙血清分离组分的抗菌活性

经嗜水气单胞菌诱导 3 d 的牛蛙血清经 Sephadex G-25 柱分离,共得到 120 管分离液,由

各组分的 OD₂₈₀ 可知,牛蛙血清中主要蛋白成分集中在第 5 管至第 40 管(图 2)。在各分离液中,大部分在嗜水气单胞菌平板上不能形成抑菌圈,在少量能形成抑菌圈的分离液中既有分子量较大的组分(第 6、7、8、9、10、11、12 管),也有分子量较小的组分(第 43、44、45 管)。

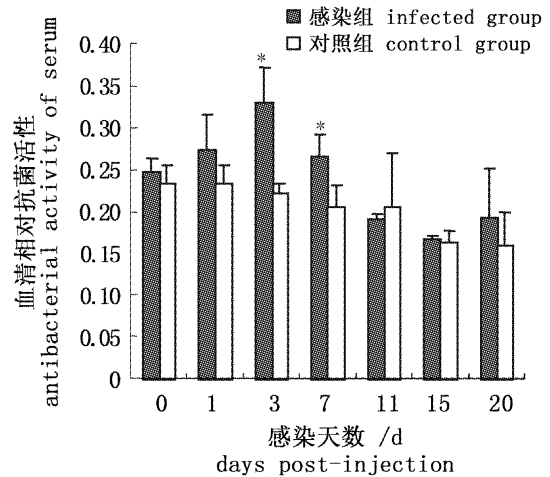


图 1 牛蛙血清抗菌活力变化

Fig. 1 The variation of antibacterial activity of bullfrog serum post-injection

*: 表示存在显著性差异

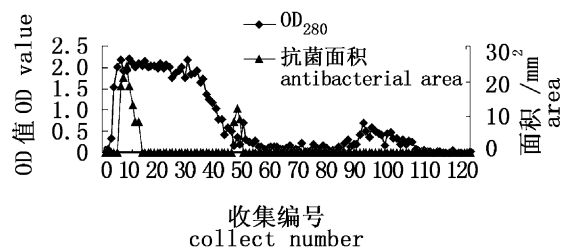


图 2 牛蛙血清层析图谱及相应抗菌面积

Fig. 2 Chromatographic patterns and antibacterial area of bullfrog serum

2.3 抗菌谱

具有抗嗜水气单胞菌活性的组分对金黄色葡萄球菌等 10 株指示菌的抗菌活性见表 1。10 管分离液均对部分革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌有抗菌作用,表现出具有较广的抗菌谱,但对溶壁微球菌、粪肥纤维单胞菌和黄色八叠球菌无抑制作用。

2.4 蛋白质分析

各分离组分的 SDS-PAGE 电泳结果如图 3 所示。从电泳图谱来看,经 Sephadex G-25 分离

活性峰收集液还不纯,需进一步纯化。但各组分中的蛋白质条带都比原血清少,且6~12号收集

管的蛋白条带明显多于43~45号收集管,且分子量较大,非小肽类。

表1 分离组分的抗菌谱

Tab.1 Antibacterial range of serum fractions

指示菌 indicating bacteria	抗菌蛋白抑菌圈直径(mm) antibacterial diameter of antibacterial protein									
	6	7	8	9	10	11	12	43	44	45
金黄色葡萄球菌	—	—	6.0	—	—	—	—	5.7	6.1	6.0
大肠杆菌	6.0	5.8	6.5	6.0	6.0	5.5	5.5	6.0	6.2	6.0
枯草芽孢杆菌	—	—	5.5	—	5.9	6.0	6.0	5.5	5.5	5.5
铜绿假单胞菌	—	6.0	5.5	—	—	—	—	6.5	6.5	6.5
溶壁微球菌	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
溶藻弧菌	5.6	—	—	5.5	6.0	—	—	6.0	6.2	6.0
粪肥纤维单胞菌	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
黄色八叠球菌	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
迟缓爱德华氏菌	6.0	6.1	5.5	6.1	—	—	—	—	—	—
普通变形杆菌	6.0	—	6.1	6.0	—	—	—	—	6.0	—

注:“—”表示无抑菌圈

Notes: “—” means no antibacterial activity

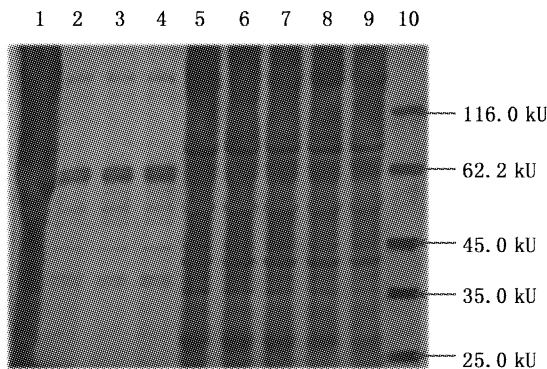


图3 牛蛙血清抗菌蛋白 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE profiles of antibacterial protein from bullfrog serum

1. 血清;2. 45号收集管;3. 44号收集管;4. 43号收集管;5. 6号收集管;6. 7号收集管;7. 8号收集管;8. 10号收集管;9. 12号收集管;10. 标准的蛋白分子量

1. indicates serum;2. indicates No. 45 filtration; 3. indicates No. 44 filtration; 4. indicates No. 43 filtration; 5. indicates No. 6 filtration; 6. indicates No. 7 filtration; 7. indicates No. 8 filtration; 8. indicates No. 10 filtration; 9. indicates No. 12 filtration; 10. indicates standard protein marker

抗菌谱和 SDS-PAGE 电泳结果表明,6~12号收集管抗菌物质成分相对较杂,各管间抗菌谱存在一定的差异,而43~45号收集管抗菌物质条带较清晰,抗菌谱等基本一致。

3 讨论

国内外对两栖类抗菌物质的研究主要集中在皮肤^[19],通过人工感染诱导产生抗菌物质主要集

中在昆虫类,诱导牛蛙血清产生抗菌物质的相关研究还未见报道。蓝江林等^[20]认为美洲大蠊在接种24h后血淋巴即可表现出抑菌活性,在接种后72h左右抑菌活性达到最大值,随后活性开始下降;齐静姣等^[21]认为用热灭活的绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌诱导家蝇抗菌物质活性在第3天才达高峰。本研究以嗜水气单胞菌感染牛蛙,诱导产生抗菌物质,感染后即可产生抗菌物质,并于感染后第3天牛蛙血清的抗菌活力达到峰值,随后活性逐步下降,这说明牛蛙经诱导的体液防卫高峰期与美洲大蠊、家蝇存在相似性。此外,感染组牛蛙血清在感染后0~7d对嗜水气单胞菌的抗菌作用高于对照组,这说明牛蛙免疫细胞中的抗菌因子能在很短时间内被激活,并释放到细胞外环境中,且抗菌物质的活力较高;在感染中后期,感染组牛蛙血清抗菌活力恢复到对照组水平,这说明这些抗菌物质在体内的半衰期很短,并且其抗菌物质的产生可能受某种基因的调控。诱导后产生的抗菌物质具有较广的抗菌谱,说明在感染初期牛蛙先激活体内的非特异性抗菌因子。这个过程表明,牛蛙抗菌物质的诱导免疫可能具有触发性,在正常情况下产生这些抗菌物质的基因处于静止状态,当嗜水气单胞菌突破牛蛙的机械屏障进入其体内后,牛蛙能够迅速开启体内的非特异性抗菌因子开关,通过基因启动、DNA转录,再翻译成抗菌物质,以抵制病原体——嗜水气单

胞菌的侵入,从而保护自身免受损伤。

牛蛙体内具有完整的细胞免疫系统和体液免疫系统^[22]。抗菌物质是免疫系统的一个重要成分,包括嗜中性粒细胞和巨噬细胞在内的吞噬细胞在吞噬细菌的同时能够向血液中释放补体、凝集素、溶菌酶、抗菌肽等物质,这些物质能够直接杀灭或抑制入侵的病原菌^[23]。本研究中牛蛙在感染后第3天(即72 h内)血清的抗菌活力达到峰值,从时相看,这属于非特异性免疫阶段^[24],凝集试验的结果也表明此时牛蛙血清中尚未有特异性抗体,这说明此时血清中的抗菌物质并非抗体。牛蛙血清经 Sephadex G-25 柱分离后,收集的样品中只有少数表现出一定的抗菌作用,其余大部分都没有抗菌活性,这说明通过 Sephadex G-25 柱可以有效地将大部分没有抗菌作用的物质分离开,有助于进一步纯化抗菌物质。经分离后的各样品的抗菌活力均不如粗血清,这可能是由于抗菌物质经 Sephadex G-25 柱分离后被稀释,也可能是因为粗血清中某些成分协同作用表现出抗菌活性,过柱后这些物质被分离从而丧失了协同作用。蛋白质经凝胶层析柱分离过程中较大分子量的蛋白质最先被洗出,通过 SDS-PAGE 电泳结果表明收集样品中的蛋白质分子量都比较大,特别是抗菌活性较强的几个样品,由此可以认为在试验中表现出抗菌活性的物质可能不是小分子的抗菌肽。由于初步分离的抗菌物质对溶壁微球菌没有溶菌作用,因此在本研究中主要的抗菌物质可能不是溶菌酶。

SDS-PAGE 电泳结果表明表现出抗菌活性的两组样品中的成分差异很大,抗菌谱试验结果表明它们有不同的抗菌谱,这说明被细菌刺激诱导的牛蛙血清中可能存在多种抗菌蛋白。这些抗菌蛋白的纯化工作正在进行中。

从以上研究结果可以看出:牛蛙被嗜水气单胞菌感染后能够迅速开启体内的非特异性抗菌因子开关,很快产生多种抗菌物质;主要的抗菌物质是分子量比较大的物质;这些抗菌物质对部分革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌有抗菌作用。

参考文献:

- [1] 徐桂耀. 牛蛙养殖[M]. 北京: 科学技术出版社, 1994.
- [2] 胡成钰,洪一江. 牛蛙红腿病病原研究[J]. 中国

水产科学, 2000, 7(2): 126-129.

- [3] 冯现维,宋新安,吴春昌. 牛蛙的病害防治[J]. 特种经济植物, 2003, 10: 44.
- [4] Glorioso J C, Amborski R L, Amborski G F, et al. Microbiological studies on septicemic bullfrogs [J]. Am J Vet Res, 1974, 35(9): 1241-1245.
- [5] 周常义,陈晓凤,吴俊林,等. 牛蛙嗜水气单胞菌病的病原研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2003, 8(4): 317-321.
- [6] 袁春营,崔青曼. 牛蛙肝脏坏死病的病原及药物治疗研究[J]. 中国水产, 2000, 10: 30-31.
- [7] 贺路,艾晓辉,左文功. 牛蛙腹水病病原研究[J]. 淡水渔业, 1995, 25(3): 16-18.
- [8] 纪荣兴,邹文政,莫英军. 牛蛙“白内障”病病原的初步研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2003, 8(1): 8-11.
- [9] Ansary A, Haneef R M, Torres J L, et al. Plasmids and antibiotic resistance in *Aeromonas hydrophila* isolated in Malaysia from healthy and diseased fish [J]. J Fish Dis, 1992, 15:191-196.
- [10] Yount N Y, Yeaman M R. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides [J]. PNAS, 2004, 101(19): 7363-7368.
- [11] 蔡桂琴. 水生动物抗菌肽(Antibacterial Peptides)的研究概况[J]. 现在渔业信息, 2005, 20(2): 24-25.
- [12] Amiche M, Seon A A, Wroblewski H, et al. Isolation of dermatoin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family [J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 4583-4592.
- [13] Chia B C S, Carver J A, Mulhem T D, et al. Maculatin 1.1, an anti-microbial peptide from the Australian tree frog, *Litoria genimaculata* solution structure and biological activity [J]. Eur J Biochem, 2000, 267:1894-1908.
- [14] Jadvinder G, Wang Y Q, Li Z H, et al. Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*[J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 894-900.
- [15] 袁德云,王立梅,胡耀辉. 林蛙皮抗菌肽的提取及其某些特性的测定[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(2): 113-116.
- [16] 鄢庆彬,苏永全,王军,等. 口服免疫添加剂对养殖大黄鱼免疫机能影响的初步研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2001, 6(2): 134-137.

- [17] 张均田. 现代药理学实验方法(下册)[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [18] D R 马歇克, J T 门永, R R 布格斯,等. 蛋白质纯化与鉴定实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2000.
- [19] Wang Z, Wang G S. APD: the antimicrobial peptide database [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32:590-592.
- [20] 蓝江林, 吴珍泉. 美洲大蠊抗菌物质的诱导与提取[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2004, 33(3):30-33.
- [21] 齐静姣, 曲传智. 不同诱导源诱导家蝇抗菌物质的动力学研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(6):554-555.
- [22] 刘旭银, 胡朝锦, 税蔚晰. 动物免疫实用技术[M]. 重庆:重庆大学出版社, 1999:25.
- [23] Ellis A E. Immunity to bacteria in fish [J]. Fish Shellfish Immunol, 1999, 9: 291-308.
- [24] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 2000:241.

编写摘要的注意事项

(1) 摘要中应排除本学科领域已成为常识的内容,切忌把应在引言中出现的内容写入摘要,一般也不要对论文内容作诠释和评论(尤其是自我评价)。

(2) 不得简单重复题名中已有的信息。比如一篇文章的题名是《几种中国兰种子试管培养根状茎发生的研究》,摘要的开头就不要再写:“为了……,对几种中国兰种子试管培养根状茎发生进行了研究”。

(3) 结构严谨,表达简明,语义确切。摘要先写什么,后写什么,要按逻辑顺序来安排。句子之间要上下连贯,互相呼应。摘要慎用长句,句型应力求简单。每句话要表意明白,无空泛、笼统、含混之词,但摘要毕竟是一篇完整的短文,电报式的写法亦不足取。摘要不分段。

(4) 用第三人称。建议采用“对……进行了研究”、“报告了……现状”、“进行了……调查”等记述方法标明一次文献的性质和文献主题,不必使用“本文”、“作者”等作为主语。

(5) 要使用规范化的名词术语,不用非公知公用的符号和术语。新术语或尚无合适汉文术语的,可用原文或译出后加括号注明原文。

(6) 除了实在无法变通以外,一般不用数学公式和化学结构式,不出现插图、表格。

(7) 不用引文,除非该文献证实或否定了他人已出版的著作。

(8) 缩略语、略称、代号,除了相邻专业的读者也能清楚理解的以外,在首次出现时必须加以说明。

科技书刊编排时应注意的其他事项,如采用法定计量单位、正确使用语言文字和标点符号等,也同样适用于摘要的编写。