

鳃弧菌毒力相关基因的研究进展*

戈 蕾^{1,2} 黄 健^{2**} 李 琪¹

(教育部海水养殖重点实验室 中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003)

(农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放试验室 中国水产科学院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 鳃弧菌是引起多种海水鱼类出血性败血症的病原菌。其致病机理与各个毒力基因的协同作用密切相关。文中综述了鳃弧菌的主要毒力基因,包括编码外毒素、粘附因子、侵袭因子、细胞表面成分以及铁吸收系统的基因和部分检测方法。

关键词 鳃弧菌,毒力相关基因,检测

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0584-03

Advance in Studies on Virulence Genes of *Vibrio anguillarum*

GE Lei^{1,2} HUANG Jie² LI Qi¹

(Key Lab of Mariculture Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071)

Abstract Vibriosis is fish disease responsible for considerable economic hardship to mariculture operation worldwide. *Vibrio anguillarum* is an important infectious agent. The first step of infection requires attachment of the bacterium to the host. The flagellum has been suggested to be involved in virulence as a motility organelle that carries an adhesive component. The iron-uptake system of *v. anguillarum* is important to the pathogenic process. Extracellular compounds such as hemolysin and metalloprotease have been involved in virulence too. The article reviews all factors including exotoxin, adherence factors, invasion factors, cell surface components and iron-uptake system.

Key words *Vibrio anguillarum*, Virulence gene, Detection

鳃菌病是世界范围内对海水养殖业造成严重经济损失的鱼类疾病,主要由鳃弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌和哈维氏弧菌等引起^[1]。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)隶属于弧菌科(vibrionaceae)弧菌属(*Vibrio*)^[2],是引起多种海水鱼类出血性败血症的病原菌^[3]。国内外学者多方面研究后普遍认为鳃弧菌的致病性与其产生的毒素密切相关。许多学者从分子水平对鳃弧菌开展了研究,为阐明鳃弧菌的致病机理提供了一些理论依据,并建立起针对几种主要毒力因子的检测手段。本文综述了鳃弧菌主要毒力相关基因及其检测手段,以期对鳃弧菌致病机理的研究及鳃弧菌的防治提供参考和借鉴。

1 主要毒力相关基因

1.1 外毒素(exotoxin)

1.1.1 溶血素(hemolysin):目前国内外研究资料表明鳃弧菌

有6条溶血素基因序列:*vah1*、*vah2*、*vah3*、*vah4*、*vah5*和M3株的溶血素基因。Hirono克隆了一个5kb的溶血素片段,其中一个为*vah1*的开放阅读框2253bp,对应751个氨基酸残基^[4]。邹玉霞等用PCR扩增出鳃弧菌M3株的溶血素基因,推测的氨基酸编码序列与已发表的A型血清的鳃弧菌PT84057株有86%的相似性,并证明所克隆的溶血素基因对鳃弧菌M3的毒力没有直接的作用^[5]。在随机基因组测序中,鳃弧菌所有的溶血素基因与弧菌属的其它物种如O1型霍乱弧菌E1Tor、副溶血弧菌和创伤弧菌的溶血素基因相似程度都很高^[6]。

Rodkhun(2005)对*vah2*、*vah3*、*vah4*、*vah5*等4个溶血素基因进行了克隆和测序,4个基因都有很多开放阅读框,分别编码含有291、690、200和585个氨基酸残基的多肽,预测分子量分别为33kD、75kD、22kD和66kD,*vah2*的产物与假定的创伤弧菌YJ016的溶血素有89%的相似性,*vah3*的产物

* 农业部948项目资助(No.2005-Z50)

** 通讯作者 Tel:0532-85823062, E-mail: aqadis@public.qd.sd.cn

收稿日期 2006-06-30, 修回日期 2006-08-21

的铁离子转运蛋白 FatABCD, FatA 是结合铁-anguibactin 复合物的受体^[23]; fatB 编码一个 35kD 的 FatB 蛋白, 是一个结合含铁复合物的内膜脂蛋白^[24]; fatC 和 fatD 编码内膜蛋白, 它们催化含铁复合物从外周质转移到胞质内。含铁复合物被转运进胞内后, 三价铁离子被还原成二价, 由于二价铁离子与铁载体的亲和力小, 铁离子就从复合物上被释放到胞质^[21]。

铁转运系统在铁离子有限的条件下被最大量的表达, AngR 蛋白和 TAF 区域产物协同正向调节这一系统的表达; 在二价铁离子存在条件下, Fur 蛋白和反义 RNA (RNAa) 介导铁离子转运基因的反向调节, 高浓度的铁本身也会关闭这一系统许多基因的表达, 这个过程与 Fur 蛋白一起行使抑制功能^[23]。

2 检测方法

目前, 鳃弧菌的检测方法报道有很多, 免疫学检测如间接荧光抗体技术^[25]、核酸杂交^[26, 27]及 PCR 检测^[28]等, 它们的灵敏度一般可达到每克鱼组织 10^6 个细菌, 核酸杂交灵敏度可以达到 150pg, 但是免疫检测需要制备抗血清。近年来, 不少学者以毒力基因设计引物进行 PCR 检测, Rodkhum 针对鳃弧菌的五个溶血素基因设计引物进行多重 PCR 检测, 这种方法不仅成功的在含有 100fg 染色体模板 DNA 中检测出溶血素基因, 甚至能直接检测出仅含有 10 个鳃弧菌的临床样品。

3 展望

近年来随着分子生物学技术的发展, 许多研究毒力基因的缺失和突变对菌株致病力的影响结果发现很多毒力基因和鳃弧菌的致病性直接相关。最新研究资料表明鳃弧菌也存在很多模式弧菌的同源毒力基因, 这需要进一步的实验验证。目前, 在国内海水鱼类的养殖过程中, 频繁使用抗生素使致病菌产生耐药性, 耐药质粒在细菌之间的水平传播给鱼病防治工作带来新的挑战。到现在为止, 还没有彻底阐明鳃弧菌的致病机理, 所以对于毒力基因功能的研究还应该继续开展, 在此基础上, 制备具有强大检测功能的基因芯片, 快速高通量的检测会缩短诊断时间, 加快研制口服和浸浴疫苗也是一种极具生产应用价值的防治途径。

参考文献

[1] Santiago F G, Melissa J K, Michael E N, *et al.* Journal of clinical microbiology. 2004, **42**(4): 1414 ~ 1419.
 [2] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》编译组译. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. (第八版). 北京: 科学出版社, 1984. pp.475 ~ 481.
 [3] Milton D L, Norqvist A, Wolf-watz H. Journal of Bacteriology, 1992, **174**(22): 7235 ~ 7244.

[4] Hirono I, Masuda T, Aoki T. Microb Pathog, 1996, **21**(3): 173 ~ 182.
 [5] 邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 高技术通讯 2005, **15**(3): 93 ~ 98.
 [6] Rodkhum C, Stork H M, Lorenzo M D, *et al.* Journal of Fish Diseases 2006, **29**: 157 ~ 166.
 [7] Rodkhum C, Hirono I, Crosa J H, *et al.* Microbial Pathogenesis, 2005, **39**: 109 ~ 119.
 [8] Lally E T, Hill R B, Kieba I R, *et al.* Trends in Microbiology, 1999, **7**: 356 ~ 361.
 [9] Boardman B K, Fuller S K J. Journal of Bacteriology, 2004, **186**(23): 8137 ~ 8143.
 [10] Jarma E, Corradino G, Regassa L B. Microb Pathog, 2004, **37**(1): 29 ~ 33.
 [11] Cortajarena A L, Goni F M, Ostolaza H. J Biol Chem, 2002, **277**(26): 23223 ~ 23229.
 [12] Milton D L, Toole R, Horstedt P, *et al.* Journal of Bacteriology, 1996, **178**(5): 1310 ~ 1319.
 [13] Mcgee K, Horstedt P, Milton D L. Journal of Bacteriology, 1996, **178**(9): 5188 ~ 5198.
 [14] Norqvist A, Norman B, Wolf-watz H. Infection And Immunity, 1990, **58**(11): 3731 ~ 3736.
 [15] 陈吉祥, 李筠, 王祥红, 等. 高技术通讯 2002, **6**: 106 ~ 110.
 [16] Denkin S M, Nelson D R. Applied And Environmental Microbiology, 2004, **70**(7): 4193 ~ 4204,
 [17] Norqvist A, Wolf-watz H. Infection And Immunity, 1993, **61**(6): 2434 ~ 2444.
 [18] Welch T J, Crosa J H. Infection And Immunity, 2005, **73**(9): 5864 ~ 5872.
 [19] Milton D L, Norqvist A, Wolf-Watz H. Gene, 1995, **164**(1): 95 ~ 100.
 [20] Susana M, Carlos R O, Manuel L L. Journal of Bacteriology, 2004, **186**(18): 6159 ~ 6167.
 [21] Manuela D L, Michiel S, Marcelo E, *et al.* Journal of Bacteriology, 2003, **185**(19): 5822 ~ 5830.
 [22] Manuela D L, Sophie P, Michiel S, *et al.* Journal of Bacteriology, 2004, **186**(21): 7327 ~ 7336.
 [23] Qian C, Jorge H C. The Journal of Biological Chemistry, 1996, **271**(31): 18885 ~ 18891.
 [24] Actis L A., Tolmashy M E, Crosa L M, *et al.* Mol Microbial, 1995, **17**(1): 197 ~ 204.
 [25] 余俊红, 姚斐, 俞勇, 等. 海洋水产研究, 2002, **23**(2): 38 ~ 44.
 [26] Gonzalez S F, Osorio C R, Santos Y. Journal of Fish Disease, 2004, **27**(11): 617 ~ 621.
 [27] Martinez P J, Blanch A R, Jofre J. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**(2): 732 ~ 737.
 [28] Rodkhum C, Hirono I, Crosa JH, *et al.* J Microbiol Methods, 2006, **65**(3): 612 ~ 618.