

鳗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 鳗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。文中综述了鳗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 鳗弧菌,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

弧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,主要由鳗弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌和哈维氏弧菌等引起^[1]。鳗弧菌(*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鳗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鳗弧菌开展了研究,为阐明鳗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。本文综述了鳗弧菌主要毒力相关基因及其检测手段,以期对鳗弧菌致病机理的研究及鳗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鳗弧菌

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扩增出鳗弧菌M3株的溶血素基因,推测的氨基酸编码序列与已发表的A型血清的鳗弧菌PT84057株有86%的相似性,并证明所克隆的溶血素基因对鳗弧菌M3的毒力没有直接的作用^[5]。在随机基因组测序中,鳗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

与 O1 型霍乱弧菌的溶血素相关蛋白有 68% 的相似性, *vah4* 的产物与 O1 型霍乱弧菌的热稳定溶血素有 72% 相似性。纯化的溶血素蛋白对鱼类、绵羊和兔的红细胞有溶血活性。构建鳗细菌的 4 株溶血素变异株进行彩虹鲷稚鱼的攻毒实验, 这四株变异株的毒力都比野生株要小^[7]。

1.1.2 重复序列毒素(repeat in toxin ,RTX) :RTX 毒素是几种革兰氏阴性菌产生的重要毒力因子 ,属于 I 型分泌系统的孔形成毒素家族 ,该家族还包括溶胞素、金属蛋白酶和脂肪酶 ,都有共同的基因组分和显著不同于其它的结构。 RTX 毒素的结构组成通常是在蛋白的 C 末端附近富含重复序列 L/I/F-G-G-X-G-N/D-D-X^[8]。 RTX 毒素在多种病原菌中都有论述 ,如霍乱弧菌、胸膜肺炎放线杆菌和大肠杆菌 O157 : H7^[9,10,11] , Rodkhun (2006)首次报道了鳃弧菌的 RTX 毒素基因 (rtxA)、RTX 毒素转运基因 (rtxB)、RTX 毒素激活蛋白基因 (rtxC)和 RTX 毒素转运基因 (rtxD)^[6]。

1.2 粘附因子(adherence/clonization factor)

1.2.1 鞭毛 (flagellum) 鳃弧菌的鞭毛是感染鱼类的毒力细胞器。鞭毛的纤丝是由鞭毛蛋白 A (FlaA) 和 3 个附加的鞭毛蛋白 FlaB、C、D 组成, *flaA* 的一个极突变株和 4 个框内缺失突变株与野生株相比, 电子显微镜观察所有的突变株都只具有部分运动能力, 而且鞭毛变短。*flaA* 基因对应一个 40kD 的蛋白, 毒力实验中 N 端缺失株、两端缺失株和 942bp 位点缺失株在浸浴感染时 LD₅₀ 增大了 70 ~ 700 倍, 而腹腔注射感染没有显示出致病力。相对而言, 极突变和羧基端缺失突变在两种感染实验时显示约 10⁴ 倍的增长, 所以 FlaA 必须越过鱼类体表这一屏障, 可能在对宿主的侵袭中起重要作用^[12]。

编码 FlaB、C、D、E 的基因在两个分离的 DNA 位点上的鞭毛蛋白基因图谱与副溶血弧菌很相似,也分别位于两个 DNA 位点上。这两个位点的遗传组成在两种菌内是保守的。构建每个基因的框内、5'端、3'端的缺失株,突变株除了 flaE,都引起了纤丝上的鞭毛蛋白的缺失,但没有纤丝明显的结构损伤,仅运动能力轻微降低。除两个突变株外,所有的突变株都表现出野生株的毒力表型, *flaD* 和 *flaE* 的 5'端缺失突变株在腹腔注射和浸浴感染中都出现了毒力显著降低,表明 *flaA*、*flaD* 和 *flaE* 与鳃弧菌的毒力有关^[13]。

1.2.2 菌毛 (pilus) 鳃弧菌 IV 型菌毛基因对毒力机制的影响目前还尚不清楚, Rodkhum 鉴别出鳃弧菌与霍乱弧菌和创伤弧菌具有很高相似性的菌毛基因: IV 型菌毛亚单位生物合成蛋白基因 (pilC)、IV 型菌毛装配蛋白基因 (pilB) 和 IV 型菌毛装配蛋白 (pilQ)^[6]。

1.3 侵袭因子(invasion factor)

Norqvist 分离到一个有侵袭缺陷的鳃弧菌突变株,对彩虹鲑浸浴感染的半数致死浓度 (LD_{50}) 比野生株高 1000 倍,而腹腔注射感染仅高 10 倍,显示出低蛋白酶活性。从胞外产物中分离鉴别了一个与侵袭力有关的锌金属蛋白酶

(*empA*) 分子量为 36kD, 它需要 Zn^{2+} 的激活, 稳定性与 Ca^{2+} 有关^[14]。遗传研究资料表明锌金属蛋白酶与鳃弧菌 NB10 的侵袭机制有关, Milton 克隆了这个金属蛋白酶基因并测序, 该序列编码 611 个氨基酸, 含有一个推测的信号肽, 后面是一个前导序列和成熟蛋白(44.6kD), 提纯后蛋白的分子量为 36kD, 蛋白序列分析表明它与其它细菌的金属蛋白酶相比在锌结合区和活性位点区域有很大相似性, 在蛋白酶基因中插入外源性 DNA 构建了一个突变体, 此突变体并不分泌蛋白酶^[3]。陈吉祥应用 PCR 扩增从鳃弧菌 W21 染色体 DNA 中扩增出一条长约 1.925kb 的特异性 PCR 产物, 序列分析表明该片段含有完整的金属蛋白酶基因阅读框, 编码 611 个氨基酸残基的蛋白质^[15]。*empA* 在细菌稳定生长期表达分泌, 与野生株相比两株 *empA* 突变株对大西洋鲑的毒力减弱, 表明 *empA* 是鳃弧菌感染过程中很重要的毒力因子, *empA* 的表达需要 σ^s 、群体感应分子和鱼类胃肠粘液的存在^[16]。

1.4 细胞表面成分(cell surface components)

主要表面抗原在鱼类感染过程中被表达。鞭毛鞘结构在侵袭的最初阶段是不起作用的,而是在鱼类爆发性系统感染时起协同作用^[17]。Welch 用 Southern 印迹法分析鳃弧菌的染色体编码的 O1 抗原基因,鉴定了 dTDP-鼠李糖合成基因和上游的 JUMP 起始序列,它们在涉及脂多糖(LPS)中心合成基因的 *rfb* 区转录。这些基因的下游有两个基因——*wzm* 和 *wzt*,它们的产物涉及 O 抗原的输出,再下游是插入成分 IS1358。*rfb* 区下游的几个开放阅读框对应与许多 *rfb* 相关蛋白,如 *wbhM* 和 *wbhL*,分别命名为 *virA* 和 *virB*,对应分子量为 36kD 和 42kD 的蛋白,两个基因突变株不管是腹腔注射还是浸浴实验都显示出显著的减毒现象。免疫金电子显微镜和主要表面抗原分析显示,它们都涉及鳃弧菌表面抗原脂多糖的生物合成^[18]。*virC* 基因编码 51.4kD 的蛋白,与 GenBank 里的其它蛋白无相似性,*virC* 的质粒插入性突变株与非突变株相比对彩虹鲑的 LD₅₀降低了 10⁵ 倍,原因是突变株缺乏主要表面抗原 LPS,表明 *virC* 是鳃弧菌的毒力相关基因,涉及 LPS 的合成^[19]。

1.5 铁吸收系统(iron uptake system)

质粒编码的铁离子吸收系统由铁载体 *anguibactin* 和特殊的铁离子转运蛋白组成。含有毒力质粒的鳗弧菌能够利用氯高铁血红素和血红蛋白作为自身新陈代谢的离子源^[20], 从载铁蛋白螯合物的周质中形成铁-*anguibactin* 复合物从而摄取铁离子。Manuela 公布了 *pJM1* 的全序列, 这个环状质粒有 65009bp, 59 个开放阅读框中有 41 个对应表现生化特性的蛋白。所有的开放阅读框的功能可以归为三类: 铁离子利用、转运和复制的断开。约有 1/3 的开放阅读框和相关基因与铁的代谢功能有关^[21]。Anguibactin 的分子量为 348D, 分子组成很特殊, 其分子式被确定为 ω -N-羟基- ω -(2'- α -羟苯基)-噻唑啉-4-烷基-羧基-组胺^[22]。可溶性的 *pJM1* 编码

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, Rodkhun 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, 这需要进行进一步的实验验证。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] Rodkhun C, Stork H M, Lorenzo M D, *et al.* Journal of Fish Diseases 2006, **29**: 157 ~ 166.
- [7] Rodkhun 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] Rodkhun C, Hirono I, Crosa J H, *et al.* J Microbiol Methods, 2006, **65**(3): 612 ~ 618.