

## 从许氏平鲈体表分离海分枝杆菌的鉴定及其脂多糖的抗原性分析

绳秀珍, 孟鹏, 徐晓丽, 战文斌\*

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 从许氏平鲈粘液、背鳍、鳃等部位分离筛选到同一菌株 FZ09, 经形态学观察、生理生化特性及热激蛋白 65(HSP65)基因序列分析, 鉴定菌株 FZ09 为海分枝杆菌。分别用酚-氯仿-甲醇法、乙醇-酚水法和传统热酚水法提取菌株 FZ09 的脂多糖(LPS), 分析了 LPS 的组成和抗原性差异。SDS-PAGE 结果表明, 3 种方法提取的 LPS 条带分布基本相同, 主要条带分子量分别为 14、16 和 23 ku, 其中以乙醇-酚水法提取的 LPS 含量和纯度最高, 热酚水法提取的 LPS 条带最多, 抗原性最好。Western-blotting 显示, 海分枝杆菌抗血清主要与 LPS 的 14 ku 条带发生特异性免疫反应。高碘酸氧化免疫印迹结果表明, 仅传统热酚水法提取的 LPS 在 14 ku 分子量区域有弱的阳性条带出现, 其他方法提取 LPS 与抗血清的免疫反应呈阴性。高碘酸氧化 ELISA 反应显示, LPS 经高碘酸氧化后与海分枝杆菌 FZ09 抗血清的反应活性降低, OD<sub>405</sub> 明显减弱。

**关键词:** 许氏平鲈; 海分枝杆菌; 脂多糖; 抗原性

**中图分类号:** Q 938.8; S 917

**文献标志码:** A

海分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*) 是鱼类和两栖类等的条件致病菌, 属腐生性非结核分枝杆菌, 一般生活于 25 ~ 37 °C 的水环境中, 能够感染 150 种海水或淡水鱼、虾、蟹类<sup>[1]</sup>。目前已开展了针对海分枝杆菌的基因组、毒力因子及在鱼体内的感染过程和症状等的研究<sup>[2-6]</sup>。海分枝杆菌感染天然宿主斑马鱼后, 巨噬细胞会转移到感染位点并且吞噬分枝杆菌, 菌体在巨噬细胞内生长繁殖, 最后形成类似结核分枝杆菌在人肺部形成的肉芽肿<sup>[3,7-8]</sup>。虾、蟹类和硬棘鱼类等感染海分枝杆菌后, 本身可能无明显症状, 但刺伤其它水产动物甚至人类后会刺引起被刺个体感染, 造成皮肤软组织溃疡, 难以治愈, 进而引起被感染个体的继发性感染, 危害极大<sup>[9-10]</sup>。目前, 已建立了海分支杆菌的 PCR-RFLP、Nest-PCR 以及反相高效液相色谱分型鉴定等检测方法<sup>[11-13]</sup>, 但对于海分枝杆菌的宿主范围、肽聚糖、胞壁蛋白、脂多糖及其免疫学特性的研究还未见相关报道。

实验从海产硬棘鱼类许氏平鲈 (*Sebastes*

*schlegeli*) 体表分离出菌株 FZ09, 经鉴定为海分枝杆菌, 使用不同方法提取海分枝杆菌的脂多糖 (LPS), 对其组成和抗原性进行了分析, 以期海分枝杆菌的免疫学及 LPS 亚单位疫苗的研究提供资料。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 细菌的分离

许氏平鲈购自青岛小港水产品市场, 体长 (25 ± 5) cm, 体表有轻度溃疡, 解剖观察内脏无明显病变; 大鼠购自青岛市药检所。

无菌条件下从许氏平鲈粘液、背鳍、鳃等部位分离细菌, 接种于罗氏培养基平板上, 34 °C 培养 7 ~ 12 d, 挑取疑似海分枝杆菌菌落进行纯化培养, 直至获得纯培养菌 (编号为 FZ09), 于液体培养基冻存液 (含 15% 甘油) 中 -80 °C 保存备用。

#### 1.2 细菌形态及生理生化鉴定

将纯化的菌株 FZ09 稀释涂布于罗氏培养基

平板,分两组,34 °C 避光培养 7 ~ 12 d 后,观察菌落特征。将其中一组置于光下至少 24 h,观察其变化。取培养物进行萼 - 纳氏抗酸染色 (Ziehl-Neelsen acid-fast stain),光学显微镜下观察菌体形态。

菌株 FZ09 的生理生化特征实验参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[14]</sup>和《伯杰氏细菌学鉴定手册》<sup>[15]</sup>(第九版)。

### 1.3 热激蛋白 65 (HSP65) 鉴定

CTAB/NaCl 法提取菌株 FZ09 基因组 DNA, TE 缓冲液溶解,作为模板进行 HSP65 基因的 PCR 扩增。所用正向引物为 Tb11: 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT- 3';反向引物为 Tb12: 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCCT- 3'<sup>[11]</sup>。反应体系为 50  $\mu$ L,反应条件为 94 °C 变性 1 min, 50 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 温育 10 min。PCR 产物回收纯化方法参照 DNA 回收试剂盒说明书 (TaKaRa 公司), 纯化产物交由上海生物工程技术有限公司进行序列测定。

将所测得的 HSP65 基因序列通过 Blast 软件在 GenBank 数据库中进行同源性比对,选取序列相似性高的菌株,采用 Clustal X 1.8 软件进行多序列匹配排列,用 Mega 2.1 软件采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 构建系统发育树,通过自举分析 (Bootstrap) 进行置信度检验,自举数集 1 000 次。

### 1.4 细菌 LPS 提取及多糖测定

将菌株 FZ09 接种于罗氏培养基,34 °C 培养 3 ~ 4 周收集表面培养物,70 °C 水浴 2 h 灭活细菌,用蒸馏水和生理盐水洗涤后,置于 -20 °C 保存备用。

酚 - 氯仿 - 甲醇法 参考文献 [16] 的方法将 0.2 g 细菌用 5 mL PBS (pH 7.4) 悬浮,超声波破碎,离心收集上清液,等体积的酚: 氯仿 (1:1, V/V) 抽提 3 次,抽提后的上清用 4 倍体积的氯仿: 甲醇 (2:1, V/V) 抽提 2 次,透析过夜,加入 DNase I 和 RNase, 37 °C 水浴 4 h, 透析过夜,贮存备用。

乙醇 - 酚水法 参考文献 [17] 的方法将 0.2 g 细菌加蒸馏水 5 mL,超声波破碎,加 DNase I 及 RNase 各 0.3 mg, 37 °C 温育 4 h; 加入 50% 乙醇溶液于 4 °C 放置 2 h, 冷冻干燥; 加苯酚和蒸

馏水各 3 mL, 在 68 °C 水浴中成匀相,冷却后取出水相,再加蒸馏水 3 mL 于酚相中萃取 1 次; 合并 2 次水相, 4 °C 透析, 去除沉淀, 回收所得为 LPS, 贮存备用。

传统热 - 酚水法 参照 WESTPHAL 等<sup>[18]</sup>的热酚 - 水法。

多糖测定 采用苯酚 - 硫酸法<sup>[19]</sup>测定多糖含量,以糖含量为横坐标,OD<sub>492</sub>值为纵坐标,制作标准曲线。取待测多糖按上述方法测得 OD<sub>492</sub>值,计算相应的多糖含量。

### 1.5 海分枝杆菌 FZ09 抗血清的制备

将菌株 FZ09 于 34 °C 培养 14 d, PBS (pH 7.4, 0.01 mol/L) 洗涤收集细菌,以 0.5% 甲醛 4 °C 灭活 48 h, 涂布平板无活菌。4 °C 离心去除甲醛, PBS 重悬。菌悬液与弗氏完全佐剂 2:1 混匀, 采用皮下 6 点注射法免疫大鼠, 每点注射 0.1 mL; 2 周后加强免疫, 菌悬液与弗氏不完全佐剂 2:1 混匀, 同法注射; 3 周及 4 周后分别加强免疫 1 次, 尾静脉注射菌悬液 0.2 mL, 无佐剂。最后一次免疫 7 d 后采血制备抗血清, -20 °C 保存备用。

### 1.6 海分枝杆菌 LPS 的组成

将所提取的海分枝杆菌 LPS 进行 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶为 4.75%, 分离胶为 15%。电泳结束后, 采用 TSAI 等<sup>[20]</sup>的方法进行银染。Bio-rad 凝胶成像系统采集图像, Gel-Pro analyser 分析软件分析不同方法提取 LPS 的组成。

### 1.7 高碘酸氧化免疫印迹反应

将不同方法提取的海分枝杆菌 LPS 经 SDS-PAGE 分离后转印至 PVDF (Millipore) 膜上, 恒压 30 V, 4 °C 转移 2 h。其中一张膜在 10 mL 高碘酸缓冲液中 (0.01 mol/L 高碘酸溶于 0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液中, pH 4.5) 氧化 1 h, 另一张膜不经过高碘酸氧化处理。将两张膜置于 5% 脱脂奶粉中, 4 °C 封闭过夜, PBST (PBS 含 0.5% Tween 20) 洗涤 3 次, 每次 5 min; 将膜浸于 1:1 000 (V/V) 稀释的海分枝杆菌 FZ09 抗血清中, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤; 再将膜置于 1:5 000 (V/V) 稀释的碱性磷酸酶 (AP) 标记的羊抗鼠 Ig (Sigma) 中, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤; 将膜放入含有氯化硝基四氮唑蓝 (NBT, 上海生工生物有限公司)、5-溴-2-氯-2-吡啶-磷酸 (BCIP, 上海生工生物有限公司) 的显色缓冲液中室温避光显色 20 ~ 30 min, 去离子水洗涤以中止反应。室温干燥, 暗处保存。

### 1.8 高碘酸氧化 ELISA 反应

将 LPS (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加入 96 孔酶标板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜; 分别加入 100  $\mu\text{L}$  及 200  $\mu\text{L}$  高碘酸缓冲液室温氧化 2 h, 每孔设 3 个对照, 对照组不经高碘酸氧化处理。处理组及对照组同时进行间接 ELISA, 海分枝杆菌 FZ09 抗血清作为第一抗体, AP 标记的羊抗鼠 Ig 作为第二抗体。显色后测定反应孔在 405 nm 处的光吸收值。

### 1.9 海分枝杆菌 LPS 的抗原性分析

将海分枝杆菌 FZ09 于罗氏培养基培养 14 d 后, 0.85% 无菌生理盐水洗脱, McFarland 比浊法调整菌浓度为  $9 \times 10^8$  CFU/mL, 分别采用尾静脉和腹腔注射方式感染大鼠, 于发病期采血制备抗血清,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。预先取正常血清作为对照。

分别以  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL 的细菌悬液和 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的不同方法提取 LPS 100  $\mu\text{L}$  包被 96 孔酶标板, PBS 包被酶标板分别作为空白, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜; 次日加入 3% 牛血清白蛋白于 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h, PBST 洗 3 次, 每次 5 min; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  稀释 (1:1 000, V/V) 的待检血清, 阴性对照组加入 100  $\mu\text{L}$  PBS, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h, PBST 洗涤; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  稀释的 AP 标记的羊抗鼠 Ig 抗体, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h, PBST 洗涤; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  新配制的对硝基苯磷酸脂 (PNPP) 发色液, 室温避光发色 5 ~ 15 min, 405 nm 处测 OD 值, P/N > 2.1 为阳性。

## 2 结果

### 2.1 细菌的分离鉴定

从许氏平鲉粘液、背鳍、鳃等部位分离筛选到同一菌株 FZ09, 其菌落呈圆形, 乳白色, 小黄花菜状, 形态为 S (光滑型), 表面干燥。细菌抗酸染色为阳性, 在光学显微镜下为直或略弯曲的棒状, 有的似竹状, 有分枝趋势, 部分聚集成团状, 无芽孢, 不运动, 直径 1 ~ 10  $\mu\text{m}$  (图 1)。34  $^{\circ}\text{C}$  培养的两组菌株 FZ09 生长情况完全相同, 经光照后产生明显的黄色色素。在对氨基苯磺酸、葡萄糖琼脂及噻吩-2-羧酸酰肼培养基上均生长, 在 5% NaCl、麦康凯琼脂培养基上不生长, 具有耐热触酶、脲酶、芳香硫酸酯酶及过氧化氢酶的特性; 吐温 80 水解实验呈阳性, 硝酸盐还原反应为阴性, 亚硝酸盐还原反应为阳性 (表 1), 生理生化特性初步鉴定菌株 FZ09 为海分枝杆菌。

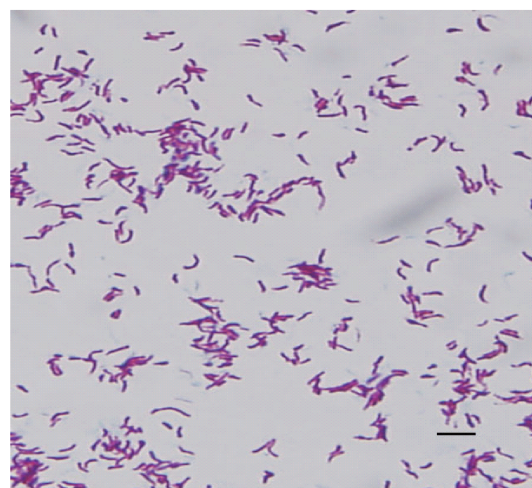


图 1 菌株 FZ09 的 Z-N 抗酸染色结果 (Bar = 20  $\mu\text{m}$ )

Fig.1 The acid-fast results of strain FZ09 (Bar = 20  $\mu\text{m}$ )

表 1 菌株 FZ09 与海分枝杆菌《伯杰氏手册》(第九版) 生理生化特征比较

Tab.1 Comparison of physiological and biochemical characteristics of strain FZ09 and *M. marinum*

鉴定项目 item	菌株 FZ09 strain FZ09	海分枝杆菌 <i>M. marinum</i>
耐热触酶 contravention of heat-resistant	+	+
对氨基苯磺酸 sulfanilic acid, PNB	+	+
噻吩-2-羧酸酰肼 thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, TCH	+	+
芳香硫酸酯酶 aromatic sulfatase	+	+
亚硝酸盐还原试验 nitrite reduction test	+	+
尿素酶 urease	+	+
5% NaCl 生长 growth on 5% sodium chloride	-	d
硝酸盐还原 nitrate reduction	-	-
过氧化氢酶 >45 mm 泡沫 catalase >45 mm foam	+	+
葡萄糖琼脂 glucose agar	+	+
麦康凯琼脂 MacConkey	-	-
吐温 80 水解 (5 ~ 15 d) tween 80 hydrolysis	+	+
25 $^{\circ}\text{C}$ 生长 25 $^{\circ}\text{C}$ , growth	+	+
28 $^{\circ}\text{C}$ 生长 28 $^{\circ}\text{C}$ , growth	+	+
37 $^{\circ}\text{C}$ 生长 37 $^{\circ}\text{C}$ , growth	+	d
40 $^{\circ}\text{C}$ 生长 40 $^{\circ}\text{C}$ , growth	-	-
45 $^{\circ}\text{C}$ 生长 45 $^{\circ}\text{C}$ , growth	-	-

注: “+” 为阳性; “-” 为阴性; “d” 代表部分菌株阳性。

Notes: “+”, positive; “-”, negative; “d”, 11 ~ 89% of strains are positive.

菌株 FZ09 的 HSP65 基因序列核酸扩增结果显示,以总 DNA 为模板,经分枝杆菌 HSP65 通用引物 Tb11 和 Tb12 扩增得到 434 bp 的核酸条带(图 2)。核酸测序后的 Blast 分析结果显示,该序列与 *M. marinum* (AJ307636) 最为接近,相似性达 99%。系统发育分析结果表明,该菌株与 *M. marinum* (AJ307636) 和 *M. marinum* (MMU55831) 聚为一个分支的置信度较高,为 85% (图 3)。

## 2.2 LPS 提取及多糖测定结果

将酚-氯仿-甲醇法、乙醇-酚水法和传统热酚水法提取的海分枝杆菌 LPS,采用苯酚-硫酸法测得 LPS 浓度分别为 153、3 350 和 1 028  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

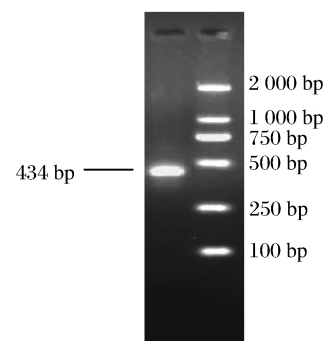


图 2 菌株 FZ09 的 HSP65 基因的 PCR 扩增产物  
M. Marker; 1. 菌株 FZ09 的 HSP65 基因的 PCR 扩增产物。

Fig. 2 PCR amplified products of HSP65 genes of strain FZ09

M. Marker; 1. HSP65 gene PCR product of strain FZ09.

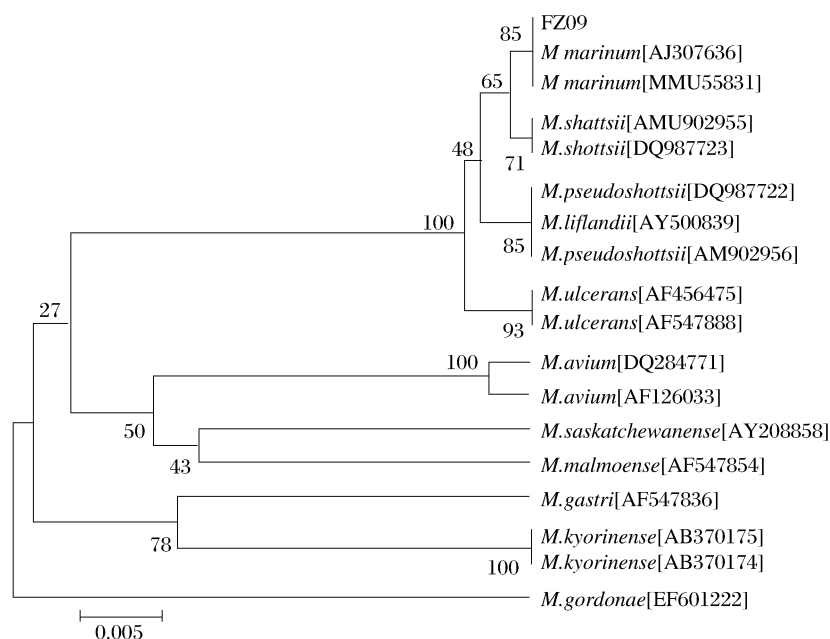


图 3 以 HSP 65 基因构建的分枝杆菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Mycobacterium* based on HSP65 gene

## 2.3 海分枝杆菌 LPS 的 SDS-PAGE 及高碘酸氧化免疫印迹结果

3 种不同方法提取的海分枝杆菌 LPS 经 SDS-PAGE 后银染结果显示,在 14、16 和 23 ku 分子量处形成了较为清晰的条带,为核心多糖部分。传统热酚水法提取的 LPS 所含蛋白带较多,条带清晰,且 14 ku 处的条带浓度明显较高;乙醇-酚水法所提 LPS 较纯;酚-氯仿-甲醇法提取的 LPS 纯度较高,但得率较低(图 4)。

海分枝杆菌 LPS 的 Western-blotting 结果显示(图 5),不同方法提取的 LPS 免疫印迹条带基本相同。海分枝杆菌 FZ09 抗血清主要与 LPS 低分子量的条带反应,在 14 ku 左右形成阳性条带(图 5-A、B、C);而乙醇-酚水法及传统热酚水法提取的 LPS 在高分子量区域与抗血清也有较弱反应。经温和高碘酸氧化后,仅传统热酚水法提取的 LPS 在 14 ku 分子量区域有弱的阳性条带出现(图 5-a、b、c)。

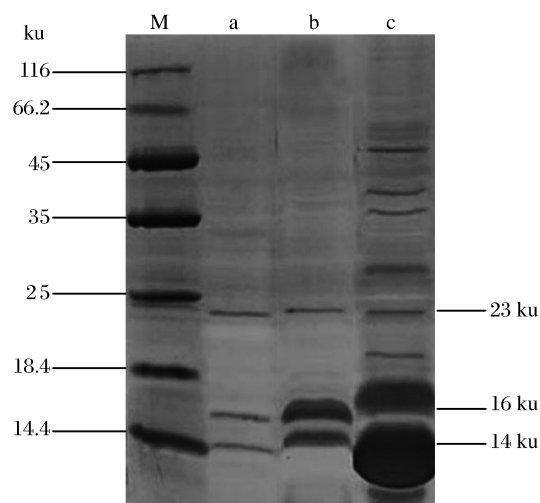


图4 不同方法提取海分枝杆菌 LPS 的 SDS-PAGE 结果

M. Marker, a. 酚-氯仿-甲醇法提取的 LPS, b. 乙醇-酚水法提取的 LPS, c. 传统热酚水法提取的 LPS。

Fig. 4 SDS-PAGE of LPS isolated from *M. marinum* by different ways

M. Marker, a. LPS obtained by phenol-chloroform-methanol extraction; b. LPS obtained by ethanol-phenol water extraction; c. LPS obtained by hot phenol water extraction.

#### 2.4 高碘酸对海分枝杆菌 LPS 免疫反应性的影响

从表 2 可以看出,几种不同方法提取的 LPS 经高碘酸氧化后,与海分枝杆菌 FZ09 抗血清的反应活性明显降低,OD<sub>405</sub> 明显减弱。以酚-氯仿-

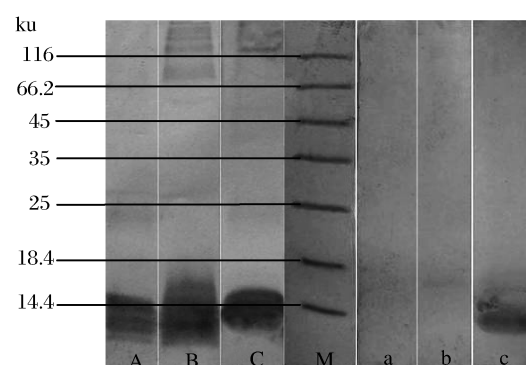


图5 不同方法提取海分枝杆菌 LPS 在高碘酸氧化前后的 Western-blotting 结果

M. Marker, A、B、C,分别为高碘酸氧化前酚-氯仿-甲醇法、乙醇-酚水法及传统热酚水法提取 LPS 的 Western-blotting 结果; a、b、c,分别为高碘酸氧化之后,3 种方法提取 LPS 的 Western-blotting 结果。

Fig. 5 Western-blotting of LPS isolated from *M. marinum* by different ways before and after periodate oxidation

M. Marker, A, B and C, before periodate oxidation, Western-blotting of LPS obtained by phenol-chloroform-methanol extraction, ethanol-phenol water extraction and hot phenol water extraction; a, b and c, after periodate oxidation, Western-blotting of LPS obtained by above-mentioned three methods.

甲醇法为例,100 和 200  $\mu\text{L}$  组的平均值分别为 0.153 4 和 0.134 1,而未经高碘酸处理的 LPS 组平均值为 0.425 3,说明提取的海分枝杆菌 LPS 抗原性受高碘酸影响,且高碘酸浓度越高,影响越大。

表 2 不同方法提取海分枝杆菌 LPS 在高碘酸氧化前后的 ELISA 结果

Tab.2 Before and after periodate oxidation, ELISA of *M. marinum* LPS isolated by different ways

	酚-氯仿-甲醇法 phenol-chloroform-methanol method	乙醇-酚水法 ethanol-phenol water method	传统热酚水法 hot phenol water method
100 $\mu\text{L}$ 高碘酸 100 $\mu\text{L}$ periodate	0.153 4	0.092 6	0.257 2
200 $\mu\text{L}$ 高碘酸 200 $\mu\text{L}$ periodate	0.134 1	0.088 3	0.236 3
无高碘酸 without periodate	0.425 3	0.443 1	0.453 6
阴性对照 negative control		0.084 5	
空白对照 control		0.051 3	

#### 2.5 3 种方法提取的海分枝杆菌 LPS 的抗原性

海分枝杆菌及 3 种方法提取的 LPS 对健康大鼠血清检测结果呈阳性(图 6)。传统热酚水法提取的 LPS 对两种方式感染海分枝杆菌的大鼠血清检测结果均呈阳性,且腹腔注射组的 P/N 值明显高于尾静脉注射组;海分枝杆菌和酚-氯仿-甲醇法、乙醇-酚水法提取的 LPS 对尾静脉注

射组的大鼠血清检测结果呈阴性,对腹腔注射组的大鼠血清呈阳性,且阳性结果的 P/N 值低于传统热酚水法提取的 LPS,说明腹腔注射的海分枝杆菌更易激发大鼠体内的免疫反应,传统热酚水法提取的 LPS 抗原性好于酚-氯仿-甲醇法和乙醇-酚水法提取的 LPS。

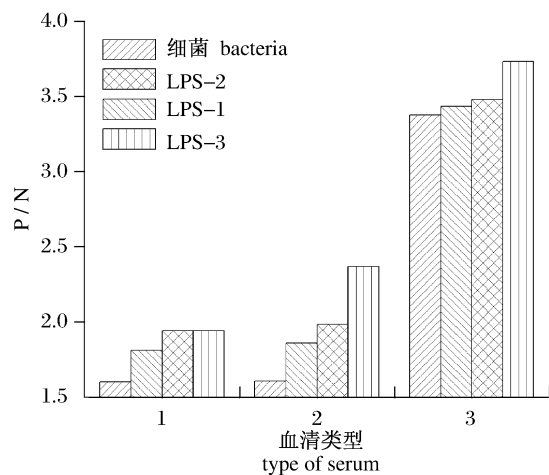


图6 海分枝杆菌及不同方法提取LPS的抗原性分析  
P/N = OD 血清/OD 阴性对照;脂多糖1,2,3 - 分别为酚-氯仿-甲醇法、乙醇-酚水法和传统热酚水法提取的LPS;1. 健康大鼠血清;2. 尾静脉注射感染海分枝杆菌的大鼠血清;3. 腹腔注射感染海分枝杆菌的大鼠血清。

Fig. 6 Antigenicity analysis of *M. marinum* and LPS isolated by different ways

P/N = OD serum/OD negative control; LPS 1, 2, 3 - LPS extracted by phenol-chloroform-methanol method, ethanol-phenol water method and hot phenol water method, respectively; 1. non-immune rat serum; 2. serum of rat infected with *M. marinum* via tail vein injection; 3. Serum of rat infected with *M. marinum* via abdominal injection

### 3 讨论

HSP65 基因是热激蛋白 60 家族成员之一,由 groEL 2 基因编码,具有高度保守性,为所有分枝杆菌所共有的基因<sup>[21]</sup>。ENA 等<sup>[22]</sup>检测了非结核分枝杆菌 HSP65 基因,结合 RFLP 技术,鉴定出 8 例皮肤感染性肉芽肿患者皮损组织培养液中的龟分枝杆菌、海分枝杆菌、偶发分枝杆菌和鸟分枝杆菌。本实验从许氏平鲉粘液、背鳍、鳃等部位分离到菌株 FZ09,通过形态学观察、生理生化特性和 HSP65 基因序列分析鉴定菌株 FZ09 为海分枝杆菌。

细菌脂多糖是细菌细胞壁外膜中的重要组成部分,由核心多糖、O-多糖和类脂质 A 3 部分组成。一般认为 LPS 是革兰氏阴性菌外膜中的重要成分<sup>[16-17]</sup>。分枝杆菌类群属于革兰氏阳性菌群,但其细胞壁中却含有独特的 LPS 成分,其中结核菌多糖类物质占细胞壁含量的 30%~40%。海洋分枝杆菌具有与结核分枝杆菌非常相似的细

胞壁结构,也含有相应的多糖成分。国内外对结核分枝杆菌 LPS 成分的研究较多<sup>[16-17,23]</sup>,但对于同属分枝杆菌属的海分枝杆菌 LPS 的相关研究报道甚少。本实验采用三种不同方法提取了海分枝杆菌 LPS,发现其 3 条主要条带中,14 ku 条带能够与海分枝杆菌抗血清发生特异性的免疫反应。3 种提取方法中以乙醇-酚水法提取的 LPS 较纯且总浓度最高;传统热酚水法提取 LPS 的条带较多,对菌株 FZ09 感染小鼠血清抗体水平的检测中,P/N 值最高,抗原性最强。在用高碘酸氧化后,LPS 免疫反应性明显降低,说明海分枝杆菌 LPS 与菌株 FZ09 抗血清的结合部位主要为多糖成分,致使它们的免疫反应受温和高碘酸氧化的影响,这与目前的研究结果相一致<sup>[24]</sup>。但经高碘酸氧化后,传统热酚水法提取 LPS 的 14 ku 条带的免疫反应仍呈弱阳性,其原因尚待进一步研究。

目前学者们致力于海分枝杆菌亚单位疫苗的研究,发现海分枝杆菌 Ag85A gene 疫苗对杂交条纹石斑鱼有较好的免疫保护作用<sup>[25]</sup>;海分枝杆菌 LPS 具有较好的免疫激发作用<sup>[26]</sup>。本实验采用不同方法提取的 LPS 血清学敏感性均高于细菌颗粒本身,推测其用于检测或作为疫苗的效果将会比灭活细菌好,所提取 LPS 为海分枝杆菌亚单位疫苗的研制奠定了基础。但对于所提取的 LPS 在鱼类免疫反应和免疫调节中的作用还有待进一步研究。

由于引起人类结核病的结核分枝杆菌仍然是严重危害人类健康的病原菌<sup>[27]</sup>。海分枝杆菌与结核分枝杆菌同属分枝杆菌属,亲缘关系极为相近,基因同源性高达 95% 以上,且生长周期相对较短,致病性和传染性低,与结核分枝杆菌有相似的致病特征,因此近年来越来越多研究者将海分枝杆菌作为研究结核分枝杆菌的模式菌株<sup>[28-29]</sup>。本实验对海分枝杆菌的分离鉴定及其 LPS 的组成和抗原性研究,也为结核分枝杆菌亚单位疫苗的研究提供了参考。

### 参考文献:

- [1] VERITY B. 海鱼分枝杆菌感染 [J]. Current Opinion in Infectious Diseases, 1999, 12: 181-184.
- [2] TIMMOTHY P S, TORS T S, HARRISON P F, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Genome Research,

- 2008,18(5):729-741.
- [3] ROBIN L, LALITA R. Insight into early mycobacterial pathogenesis from the zebrafish [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(3): 277-283.
- [4] CHRISTINE L C, KATHRYN K, ROSA K, *et al.* *Mycobacterium marinum* Erp is a virulence determinant required for cell wall integrity and intracellular survival [J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(6):3125-3133.
- [5] NIRMAL R, MARTINA W, KAREN E, *et al.* A mycobacterial gene involved in synthesis of an outer cell envelope lipid is a key factor in prevention of phagosome maturation [J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(2):581-591.
- [6] APOORVA B, NAGATOSHI F, KIRAMNAI B, *et al.* Deletion of kasB in *Mycobacterium tuberculosis* caused loss of acidfastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice [J]. *Microbiology*, 2007, 104(12): 5157-5162.
- [7] HARRIFF M J, BERMUDEZ L E, KENT M L. Experimental exposure of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), to *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium peregrinum* reveals the gastrointestinal tract as the primary route of infection: a potential model for environmental mycobacterial infection [J]. *Journal of Fish Disease*, 2007, 30(10):587-600.
- [8] KENT M L, WATRALL V, WU M, *et al.* *In vivo* and *in vitro* growth of *Mycobacterium marinum* at homeothermic temperatures [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 257(1):69-75.
- [9] VIRGINIA W, MICHAEL L K. Pathogenesis of *Mycobacterium* spp. in zebrafish (*Danio rerio*) from research facilities [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2007, 145:55-60.
- [10] GREGORY W B, DON G E. *Mycobacterium marinum* produces long-term chronic infections in medaka: A new animal model for studying human tuberculosis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2007, 145:45-54.
- [11] 蔡林, 陈雪, 赵亭, 等. 用 PCR-限制性片段长度多态性分析法检测游泳池肉芽肿中海分枝杆菌 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2007, 36(2):71-73.
- [12] 李学渊, 谭理, 谢辉, 等. 应用 Nest-PCR/核酸测序技术检测手部慢性肉芽肿性炎症的病原体 [J]. *中华病理学杂志*, 2006, 35(11):669-671.
- [13] 杜蓉, 陈保文, 郭磊, 等. 基于分枝菌酸的分枝杆菌反相高效液相色谱分型鉴定方法 [J]. *色谱*, 2008, 26(5):534-539.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [15] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H A. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Ninth Edition) [M]. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
- [16] 周丽蓉, 罗永艾, 王国治. 结核分枝杆菌脂多糖的提取及其检测血清结核抗体的研究 [A]. *中国防痨杂志*, 2007, 29(3):235-237.
- [17] 李伏田, 徐小妹, 景志春. 结核菌脂多糖和酚提取蛋白在临床血清诊断中的应用 [J]. *上海医学检验杂志*, 1998, 13(4):207-208.
- [18] WESTPHAL O, JANN K. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure [J]. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1965, 5:83-91.
- [19] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [20] TSAI C M, FRASCH C E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1997, 7: 261-271.
- [21] SHINNICK T M. The 65 ku antigen of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *The Journal of Bacteriology*, 1987, 169(3):1080-1088.
- [22] ENA P, SECHI L A, SACCABUSI S, *et al.* Rapid identification of cutaneous infections by non-tubercular *Mycobacteria* by polymerase chain reaction-restriction analysis length polymorphism of the HSP65 gene [J]. *International Journal of Dermatology*, 2001, 40(8):495-499.
- [23] NICULESCU D, STEFANOIU V, STAVRI H, *et al.* Serodiagnosis of extrapulmonary tuberculosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology*, 1999, 58(2):111-119.
- [24] 郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓义, 等. 抗哈维氏弧菌脂多糖单克隆抗体的制备及其鉴定 [J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(3):274-279.
- [25] DAVID J P, STEPHEN A S. Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine for *Mycobacterium marinum* in fish [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005, 103: 195-206.
- [26] ERIN J B, DAVID T G, PETER A V V. *In vitro* response of the striped bass natural resistance-

- associated macrophage protein, Nramp, to LPS and *Mycobacterium marinum* exposure [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2004, 138: 391 - 400.
- [27] 张舒华. 肺结核流行趋势及控制策略综述[J]. 安徽预防医学杂志, 2005, 11(1): 30 - 32.
- [28] STAMM L M, BROWN E J. *Mycobacterium marinum*: the generalization and specialization of a pathogenic *Mycobacterium* [J]. Microbes Infect, 2004, 6: 1419 - 1428.
- [29] POZOS T C, RAMAKRISHNAN L. New models for the study of *Mycobacterium* host interactions [J]. Current Opinion in Immunology, 2004, 16: 499 - 505.

## Identification and lipopolysaccharide antigenicity analysis of *Mycobacterium marinum* isolated from *Sebastes schlegeli*

SHENG Xiu-zhen, MENG Peng, XU Xiao-li, ZHAN Wen-bin \*

(Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** *Mycobacterium marinum* is an opportunistic pathogen which can infect 150 kinds of aquatic animals. In this paper, the same bacteria strain FZ09 was isolated from the mucus, dorsal fins and gills of *Sebastes schlegeli*, and was identified as *Mycobacterium marinum* by physiological, biochemical characterization and heat shock protein 65 DNA sequence analysis. Lipopolysaccharide (LPS) was extracted from strain FZ09 by phenol-chloroform-methanol method, ethanol-phenol-water method and hot phenol-water method, respectively, and the composition and antigenic differences of the extracted LPS were analyzed by SDS-PAGE, Western blotting and ELISA. The results showed that LPS extracted by three methods shared the same compositions and the main bands had molecular weights of 14, 16 and 23 ku. LPS extracted by ethanol-phenol method had the highest purity and concentration, and LPS extracted by traditional hot phenol water method had the most bands and best antigenicity. Western-blotting showed that anti-FZ09 antiserum mainly reacted with 14 ku band of the LPS, which showed a negative reaction after mild treatment with periodate except for LPS extraction by traditional hot phenol-water method that demonstrated weak positive. ELISA revealed that reactivity of anti-FZ09 antiserum and LPS decreased after periodate oxidation and OD<sub>405</sub> reduced significantly.

**Key words:** *Sebastes schlegeli*; *Mycobacterium marinum*; lipopolysaccharide; antigenicity

**Corresponding author:** ZHAN Wen-bin. E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn