家畜衛試所研報 No.43：19~26 (2008)

海鱸發光菌細胞外產物抗原性之研究

涂堅[1]*、邱芮瑜[1]、張正芳[2]、黃淑敏[1]、張惟茗[1]、趙磐華[1]

行政院農業委員會家畜衛生試驗所生物研究組[1]
行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心[2]

摘要 本研究主要目的為篩選海鱸發光菌其細胞外產物中具有抗原性的蛋白部份供疫苗發展用。此抗原性蛋白乃透過細菌的細胞外產物進行西方轉印法以海鱸抗發光菌的特異抗血清加以確認，再將此抗原性蛋白進行質譜分析。將已知氨基酸序列胜肽片段進一步與基因庫中現存序列比對，發現一個分子量約43 kDa蛋白，具有脂肪酶功能，其生物功能尚待進一步探討。

關鍵詞：抗原性、海鱸、發光菌

緒言

海鱸具有生長快速，肉質甘美等特性，我國於1994 年領先全球首度將此種野生海釣魚種成功以人工催熟方式繁殖。此後，產官學三方即迅速發展相關飼料研發、營養需求、肉質營養分析及人工海上箱網養殖技術等，並期許此種對水質僅有中等要求，快速成長的熱帶魚種能夠發展到與歐美鮭魚箱網養殖同等的規模及經濟效益。但是由於箱網人工集約養殖緊迫情況下，疾病順遂產生，其中最重要且棘手的疾病為發光菌病（Photobacteriosis）。本病不僅發生於我國的海鱸箱網養殖，目前也是歐、亞洲各國海水養殖業的重要威脅疾病，由於本病可感染多種宿主、特殊的胞內寄生方式及具多種抗藥性的特性，不易以藥物控制，因此各國均希望以疫苗來預防本病。

發光菌（Photobacterium damselae subsp. piscicida，舊稱 Pasturella piscicida）原先只存在野生魚類【15】。養殖魚類最早於 1971 年發生於日本箱網的 yellowtail 魚種【7】，但遲至 1980 年代，日人才嘗試以不活化全菌及減毒疫苗控制本病，惟效果並不佳【4, 5, 8】。自 1990 年起【16】，發光菌病陸續造成歐洲濱海養殖國家（西班牙、義大利及法國等）海水養殖的金頭鯛 gilthead seabream (Sparus aurata)及舌齒鱸 sea bass（Dicentrarchus labrax）的嚴重損失。歐洲學者開始積極投入防治研究，西班牙學者 Magarinos 等【10, 11】在 1994 年首先進行本菌疫苗之研究，比較全菌菌苗（whole cell vaccine）與類毒素全菌疫苗（toxoid enriched whole cell vaccine）保護效果，發現使用不活化發光菌合併不活化發光菌細胞外產物（extra-cellular product）的類毒素全菌疫苗免疫 2 g 的金頭鯛，攻毒後，可達到 37-41%的防禦指數（relative percent survival）；而若免疫 0.2 g 魚體則防禦指數可達到 83%。Morinigo【2】等在 2005 年亦發現 Vibrio harveyi 與發光菌雙價不活化類毒素全菌疫苗以浸泡方式免疫兩次 5-10 克重比目魚苗，兩次免疫期間間隔一個月，攻毒後可達到大於 70 %的防禦指數。以上結果證實含類毒素的全菌疫苗保護效果優於全菌菌苗，意味著細菌外產物存有重要的保護性抗原；而且免疫時魚體大小與免疫保護效果間存在重要關聯。但是有關疫苗保護力缺乏重現性的問題卻持續困擾不同實驗室的學者。雖然本菌不同分離株之 LPS 電泳圖譜相同，在血清學上享有共有的抗原性，實際上也無法以免疫血清區分出不同的血清型，但是相同的方法製造的疫苗使用於相同或不同種類魚類卻有保護作用重現性不佳的問題【1】。雖然歐洲國家如西班牙及瑞典均曾研發出針對該地區魚種發光菌之不活

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

家畜衛試所研報 No.43：19~26 (2008)

化疫苗，宣稱對該地區魚種類具保護效果，但實際在我國海鱸進行田間試驗，發現其保護性並不具重現性。鑑此，國內研究學者遂自行開發不活化疫苗，實驗室內保護效果均佳，但是田間試驗顯示此種疫苗之保護效果重現性均不佳。因此有必要對疫苗中抗原性部分做深入探討，以克服現行疫苗保護性欠佳的問題。

本研究主要目的為篩選海鱸發光菌細胞外產物中具有抗原性的蛋白部份。進一步將此種具抗原性序列與基因庫中現存序列比對，以期找出可能作為未來次單位疫苗發展用的抗原蛋白。

材料與方法

發光菌之確認

取 -80℃中保存的 Photobacterium damselae subsp. piscicida（TS95-32 株），釣菌於 Blood Agar（TSA II, 5% sheep red blood cells, BBL），25℃培養 48 小時，觀察其生長型態，並以凝集試驗套組（Mono-Pp（Bionor））確認為 Photobacterium damselae subsp. piscicida。

發光菌及其細胞外產物製造

先將確認之發光菌接種至 BHIA（2% NaCl），25℃ 下培養 24 小時，然後以無菌玻璃三角棒將細菌由 90 mm 內徑培養基刮下，懸浮於 4 ml PBS 中，將其濃度調整到 OD_{540} >1 的濃度。然後依照劉氏 cellophane 法製造【8】。概言之，將上述調妥的菌液以無菌玻璃三角棒均勻塗佈上鋪有面積大小為 20 x 28 cm cellophane 的 BHIA（2% NaCl）上， 25℃ 培養 64 小時，以 8 ml PBS, pH 7.2 洗下細菌及細胞外產物，以 8000 g、4℃，1 小時離心除去細菌，將上清液以 0.2 μm 過濾膜過濾，以 BCA protein assay （Bio-Rad®）進行定量蛋白質，存於 -80℃。下層沉澱的細菌則懸浮在 10 ml PBS 中，另外定量其含量。

海鱸抗發光菌細胞及其外產物免疫及其保護效果

選擇養在 25-28℃，流動式海水養殖槽中 50-60 克體重海鱸，共分三組，每組二十尾魚，第一、二組分別以 0.2% formalin 處理的不活化全菌或不活化細胞外產物（1 x 10^9 cells/ml 或 100 μg extracellular product）腹腔免疫一次，14 天後採血，採血後第 21 天以 1.5 x 10^8 CFU/ml 進行攻毒測試保護力；第三組則注射 PBS。收集的血清則保存於 -80℃。

海鱸 IgM 純化與小鼠抗海鱸 IgM 多株及單株抗體製造

採取 800- 1000 克體重健康海鱸血液，俟凝固後以 430 x g， 4℃ 離心 15 分分離血清，保存於 -20℃備用。利用蛋白質 A 親和性管柱（Pierce®）依廠商建議步驟純化海鱸 IgM，再經 12% SDS-PAGE 確認純度與分子量。將純化之 IgM 當成抗原與佛氏完全佐劑混合免疫 BALB/c 小鼠，每隻小鼠腹腔免疫 50 μg，14 日後以相同劑量混合佛氏不完全佐劑補強，待其抗血清達到需求即與 NS-1 細胞進行融合，以海鱸血清為抗原進行陽性單株抗體細胞株篩選，以西方轉漬法確認細胞株分泌之抗體【5】。

發光菌主要抗原性蛋白之確定

細胞外產物以 12% SDS-PAGE 分析，然後使用濕式轉漬器（Bio-Rad®）以 400 mA，4℃ 2 小時，將 SDS-PAGE 上的蛋白轉漬至 nitrocellulose membrane 上。先以含 PBST (5%脫脂奶粉溶於含 0.1% Tween-20 的 PBS) 4℃進行 1 小時填充，再以含 5%脫脂奶粉 PBST 稀釋 100x 海鱸抗發光菌抗血清做為第一抗體，在室溫下 200 rpm 震盪感作 1 小時，PBST 洗三次，每次 10 分鐘。依序以含 5% 脫脂奶粉 PBST 稀釋 100x 小鼠抗海鱸 IgM 單株抗體室溫 200 rpm 震盪感作一小時，PBST 洗三次，每次 10 分鐘；及含 5%脫脂奶粉 PBST 稀釋 1000x 山羊抗小鼠 IgG-horseradish peroxidase 抗體（Jackson Immuno Research Lab）室溫 200 rpm 震盪感作一小時，PBST 洗三次，每次 10 分鐘；最後以 Metal enhanced DAB substrate kit (Pierce®) 呈色確定具抗原性的蛋白質。

發光菌主要抗原性蛋白質譜分析

將上述具抗原性蛋白片段由電泳膠片切下，交由委託合作廠商進行質譜分析。先進行胰蛋白酶消化，然後以 Nano LC-MS/MS 系統分析及擷取 peptide 序列。peptide 序列則進一步利用 NCBI Database 的 MASCOT program 比對，找出可能之蛋白質族群。

結果

發光菌及其細胞外產物製造

以此種方法製造之細胞外產物濃度介於 588-628 μg/ml 間。而其細菌濃度介於 5 x 10^{9}-1x 10^{10} cfu/ml 間。雖然細胞外產物蛋白濃度並不高，但是由於採用 cellophane 方法，可避免細胞外產物與培養基及細菌直接接觸，不需進一步純化即可得到粗製的細胞外產物。

海鱸抗發光菌細胞及其外產物抗血清製造

取三組海鱸，腹腔免疫一次，14 天後採血，第 21 天進行攻毒試驗，攻毒後計算其 7 日內的死亡率。其中對照組死亡率為 90%，不活化全菌免疫組死亡率為 70%，不活化細胞外產物免疫組死亡率為 20%。雖然我們僅做一次試驗，但此數據顯示具有保護性的抗原存在於細胞外產物【1】，因此不活化細胞外產物免疫組的血清將作為此次篩選保護性的抗原的主要抗血清。

海鱸 IgM 純化與小鼠抗海鱸 IgM 多株及單株抗體製造

利用蛋白質 A 親和性管柱純化海鱸 IgM，經 12% SDS-PAGE 確認，其 IgM 由具有分子量約 72 KDa 重鏈及 27 KDa 輕鏈的免疫球蛋白組成（如圖一）。以小鼠抗海鱸 IgM 稀釋過的融合瘤細胞分泌抗體與 IgM 電泳轉漬圖作用，可見到均可對抗 IgM 特有的 72 kDa 重鏈及 27 kDa 輕鏈（如圖二）。表示此單株抗體已可供本次試驗使用。

發光菌主要抗原性蛋白之確定

以細胞外產物腹腔免疫二週後，免疫魚隻在高濃度抗原（39μg/15μl）轉漬時可辨識到十條蛋白片段(圖三)；而低濃度抗原（9μg/15μl）轉漬僅能辨識三條蛋白片段(圖四)。

發光菌主要抗原性蛋白質譜分析

挑選一個有抗原性的 43 kDa 蛋白質進一步分析，質譜分析比對發現此蛋白類與 Staphylococcus warneri 的 lipase（Access number: AB189475.1）（Nominal mass (M_r): 80037; calculated pI value: 8.84）碳端有 18%近似。

討論

Staphylococcus aureus 產生的蛋白質 A (Protein A)對不同動物的免疫球蛋白具有不同的吸附能力，其中對於鼠、牛、馬、山羊的 IgG 有較佳的吸附能力，但不能吸附 IgM、IgA 及 IgE【6】。本研究發現可利用蛋白質 A 親和性管柱純化海鱸 IgM ，經 12% SDS-PAGE 確認，其 IgM 由具有分子量約 72 kDa 重鏈及 27 kDa 輕鏈的免疫球蛋白組成（如圖一）。IgM 在血清中含量甚高但與其他血清蛋白同時存在，在高 pH 值(8.0)時少量吸附在蛋白質 A 親和性管柱，但是大多數 IgM 與其他血清蛋白仍被沖提(Elution) IgM 前緩衝液洗掉（如圖一 W1 可見），此與小型管柱內填充的蛋白質 A 的量有限以致無法吸附過多的 IgM 有關。但是當 pH 轉為 3.5 時，在第二次沖提時可從圖一 E2 發現明顯的重鏈與輕鏈，表示以此方法可快速純化海鱸 IgM。比起利用分子篩(Size exclusion)、離子交換（Ion exchange）原理【12, 13】或是先以某種蛋白質抗原(ligand)免疫魚類，再將此種抗原結合到載體(support)，再利用此種含有 ligand 的 support 填充製造的親和性管柱（Affinity column）分離魚類 IgM 的方法【14】，本法擁有時間短(10 分鐘)，雖然產量不高，但是對於僅需 5-50μg 抗原量的小鼠免疫試驗，不失為一簡單、快速的方法【3】。

以上述純化 IgM 做為抗原生產單株抗體，共篩選出 4 株陽性細胞株，如圖二所示為海鱸血清先經 SDS 電泳，然後再以陽性細胞株培養上清液做為第一抗體進行免疫轉漬圖中可見，其中第 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 行均可見到 IgM 特有的 72 kDa 重

家畜衛試所研報 No.43：19~26 (2008)

鏈及 27 kDa 輕鏈，此次所生產的單株抗體與市售抗海鱺 IgM 單株抗體(第 2 行)效果相當。

本研究希望透過魚體實際免疫後產生的抗體來找出細菌外產物中真正具有抗原性的蛋白片段【17】。以細胞外產物免疫組攻毒後顯示，此種疫苗對海鱺的保護力最佳(達八成)，因此進一步探索細胞外產物中具有抗原性蛋白質。將細胞外產物先進行 SDS 電泳，然後再進行西方轉漬法分析。其結果如圖三所示，以 100μg/0.1 ml 細胞外產物腹腔免疫二週後，免疫魚隻的抗體依抗原濃度高低感可辨識到不同數目的抗原性蛋白片段，其中高濃度抗原轉漬可辨識到十條蛋白片段(圖三)；而低濃度抗源轉漬僅能辨識三條蛋白片段(圖四)。取其低抗原濃度抗原性較高的三條蛋白片段，分子量分別約為 43 kDa、65 kDa 及 80 kDa，進行質譜分析。發現 43 kDa 蛋白質屬於類似 Staphylococcus warneri 製造的 lipase 蛋白質，根據質譜數據發現解序的小 peptide 片段幾乎全集中在 lipase 的 C terminal，加上另一有抗原性的蛋白片段分子量為 80 kDa，另根據部分資料推測此 43 kDa 蛋白質片段可能為 80 kDa 蛋白質的斷裂片段部份（未公開資料），真實情形尚待 80 kDa 蛋白質完全分析結果才能證實。由於魚類宿主細胞膜組成即含有脂質，此 lipase 是否為本菌毒力因子，在發光菌感染時扮演入侵的角色；是否能做為發展次單位疫苗的保護性抗原，其真正生物性功能以及其他具有抗原性的蛋白均需更進一步深入研究。

本次以原發該種疾病的海鱺做為試驗動物來篩選該病原抗原性蛋白質片段的方法並不困難，但是在獸醫界較少人使用，習慣上研究人員仍然喜歡以小鼠來從事細菌性疫苗之開發。雖然運用魚類作為實驗動物照顧上比傳統上使用小鼠來的生疏，但是運用魚類本身針對特定病原產生的抗體來篩選具抗原性蛋白片段，應該優於以魚類病原免疫小鼠產生的抗血清來篩選具抗原性蛋白片段，因為恆溫動物（小鼠）與變溫動物（海鱺）基本生理反應就不同，前者更能真實模擬變溫動物（魚類）實際活體內的免疫反應。本次所使用的方法未來應該也可以應用到類似水產病原抗原性的探討。

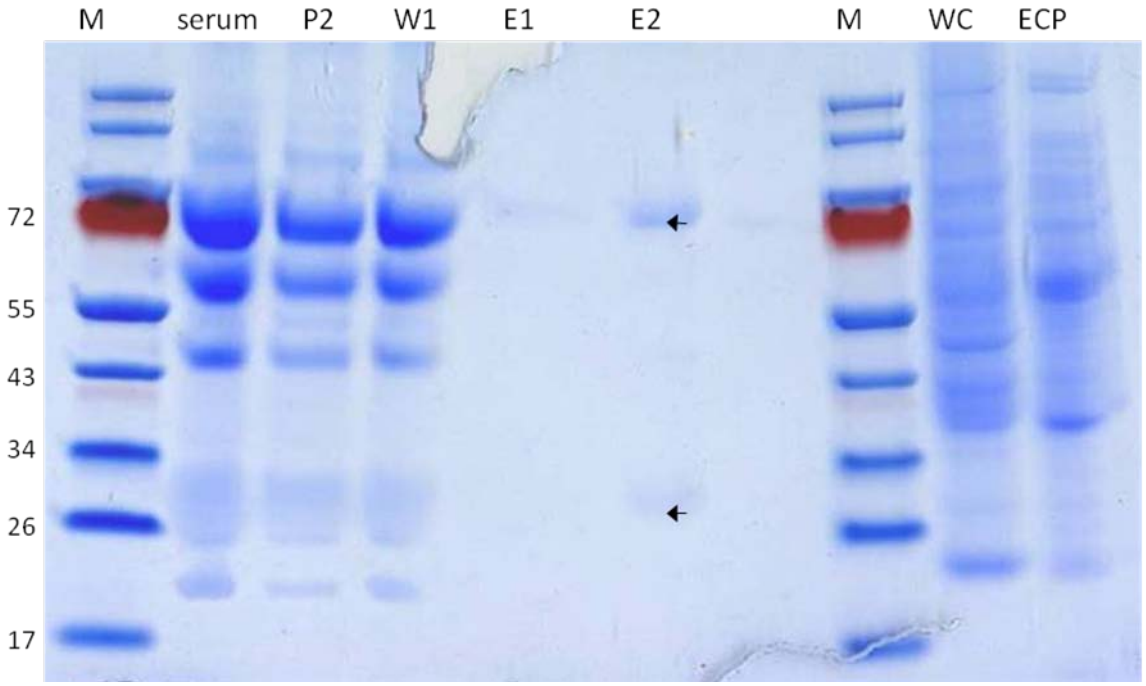
致謝

本研究（96 農科-15.2.2-衛-H1）承蒙農委會提供計畫經費及本試驗室及水產試驗所生物技術組魚病室研究人員協助，在此一併致謝。

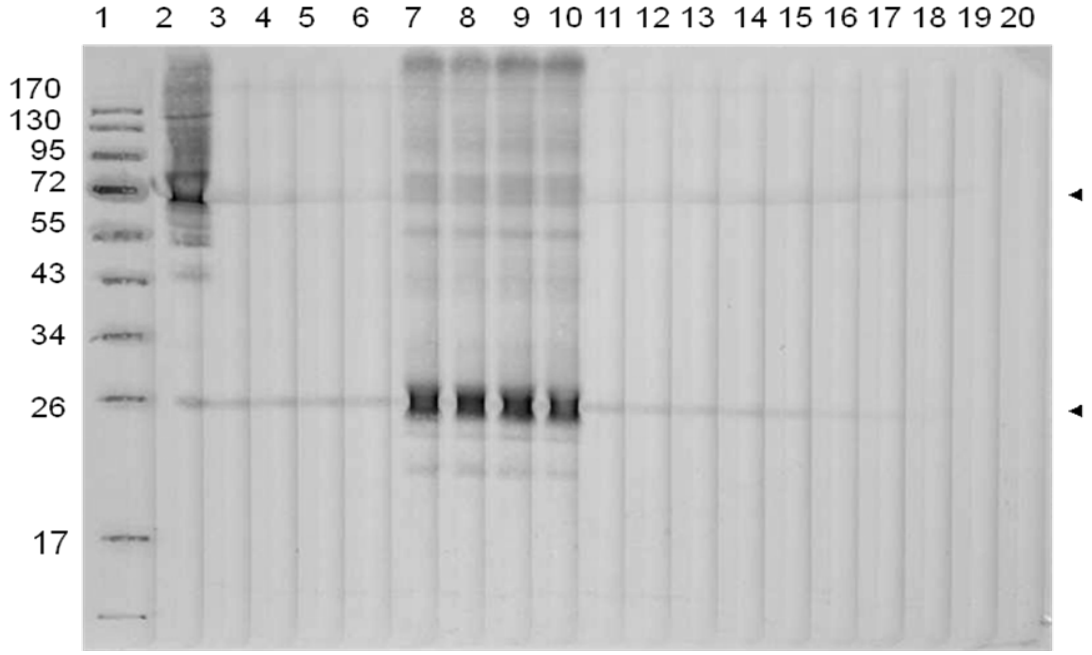
參考文獻

1. Amend DF. 1981. Potency testing of fish vaccines. In: International symposium on fish biologics: Serodiagnostics and vaccines. Dev Biol Stand 49: 447-454.
2. Arijo S, Rico R, Chabrillon M, Diaz-Rosales P, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Magariños B, Toranzo AE, Moriñigo MA. 2005. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. J Fish Dis. 1: 33-8.
3. Chang CA, John JA, Wu MS, Lee CY, Lin CH, Lin CH and Chang CY. 2006. Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain. Vet Immunol Immunopathol. 109(3-4):255-65
4. Fukuda Y, and Kusuda R. 1981. Efficacy of vaccination for pseudotuberculosis in cultured yellowtail by various routes of administration. Bull Japan Soc Sci Fish 47: 147-150.
5. Fusuda Y, and Kusuda R. 1985. Vaccination of yellowtail against pseudotuberculosis. Fish Pathol 20: 421-425.
6. Johnstone A and Thorpe R. 1988. Production of antibodies. In: Immunochemistry in practice. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 35-45,.
7. Kimura T, Kitao T. 1971. On the causative agent of tuberculoidosis of yellowtail. Fish Pathol 6: 8-14.
8. Kusuda R and Hamaguchi M. 1988. The efficacy of attenuated live bacterin of bacterin of *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in yellowtail. Bull Eur Ass Fish Pathol 8: 51-53.
9. Liu PV. 1957. Survey of hemolycin production among species of pseudomonas. J Bacteriol 74: 718-27.
10. Magarinos B, Noya M, Romalde JL, Perez G and Toranzo AE. 1994a. Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella pscicida*. Bull Eur Ass Fish Pathol 14:120-122.
11. Magarinos B, Romalde JL, Santos Y, Casal JF, Barja JL and AE Toranzo. 1994b. Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus auratus*) against *Pasteurella piscicida*. Aquaculture 120: 201-208.
12. Nakamura O, Kudo R, Aoki H and Watanabe T. 2006. IgM secretion and absorption in the materno-fetal interface of a viviparous teleost, *Neoditrema ransonneti* (Perciformes; Embiotocidae). Dev Comp Immunol. 5:493-502
13. Rajavarthini PB, Arunkumar RI and Michael RD. 2000. Partial characterization of serum immunoglobulins of *Oreochromis mossambicus*. Indian J Exp Biol. 6: 549-53.
14. Rathore G, Swaminathan TR, Sood N, Mishra BN and Kapoor D. 2006. Affinity purification and partial characterization of IgM-like immunoglobulins of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Indian J Exp Biol. 12:1018-21.
15. Snieszko SF, Bullock GL, Hollis E and Boone JG. 1964. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. J. Bacteriol 88: 1814-1815.
16. Toranzo AE, Barreiro S, Casal JF, Figueras A, Magarinos B and Barja JL. 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. Aquaculture 99: 1-15.
17. Zhao IM, Zouy YX, Ye XH, Guo DS and Hao B. 2008. Use of *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) for identification of *Vibrio anguillarum* proteins expressed during fish infection. Handbook & abstracts of the 7th symposium on diseases in Asian aquaculture. p. 45.

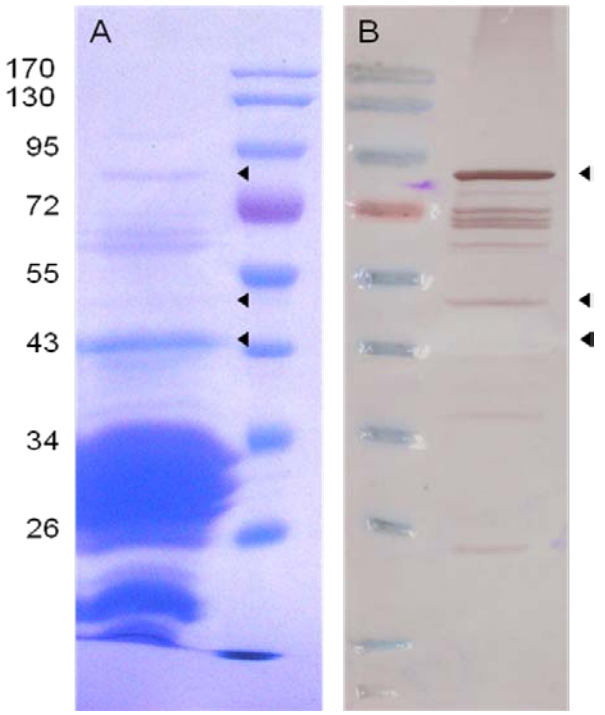
家畜衛試所研報 No.43：19~26 (2008)



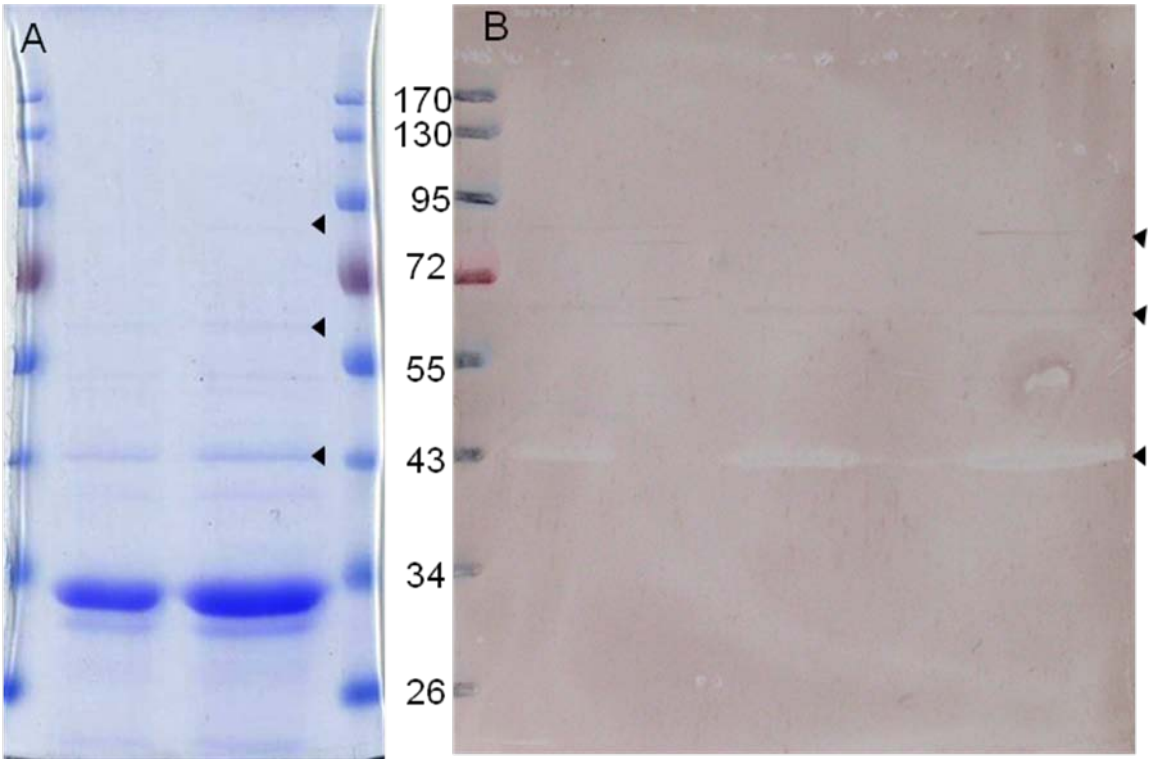
圖一、純化的海鱸 IgM SDS 凝膠電泳圖譜。箭頭表示免疫球蛋白的重鏈及輕鏈。
M: 標準分子量；serum: 海鱸血清；P2: 血清流經管柱但未被管柱吸附的部分；W1: 血清吸附管柱後，第一次的沖洗液；E1: 親和管柱的第一管沖提結果；E2: 親和管柱的第二管沖提結果；WC: 發光菌的全菌；ECP: 發光菌的細胞外產物。



圖二、融合瘤細胞分泌抗體辨識海鱸 IgM 電泳轉漬圖譜。Lane 2 為市售抗海鱸 IgM 單株抗體，Lane 3-20 為本次試驗篩選之融合瘤細胞株。Lane 3-6: 1E9 (Mb1), Lane 7-10: 1F12 (Mb2), Lane 11-14: 3C12 (Mb3), Lane 17-20: 4C9 (Mb4)。箭頭表示輕鏈（27 KDa）及重鏈（72 Kda）。



圖三、細胞外產物 SDS 凝膠電泳(A)及小鼠抗海鱸 IgM 單株抗體辨識細胞外產物的免疫轉漬圖譜(B)。樣品行濃度= 39 μg 箭頭表示有抗原性的蛋白片段



圖四、細胞外產物 SDS 凝膠電泳(A)及小鼠抗海鱸 IgM 單株抗體辨識細胞外產物的免疫轉漬圖譜(B)。箭頭表示有抗原性的蛋白片段

NATIONAL CENTRAL LIBRARY ROC

Exp.Rep AHRI.,No.43：19~26 (2008)

The antigenicity of extracellular products of Photobacterium damselae subsp. piscicida in cobia (Rachycentron canadum)

Tu C*, Chiou RY, Huang SM, Chang WM and Chao PH

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan[1],
Tungkang Technology research center, Fisheries Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan[2]

Abstract The purpose of this study is to screen the major antigenic protein moieties of the extracellular products of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* in cobia for vaccine development. The antigenic proteins are verified through Western blot of the extracellular products reacted with the cobia antiserum against the bacteria. The collected antigenic bands were sent for mass spectrometry anaylysis and the peptide masses were compared with the protein sequences in GenBank. One 43 kDa protein was identified as a bacterial lipase and further research on its biological function will be done.

Keywords: *antigenicity, cobia, photobacterium damselae subsp. piscicida,*

* Corresponding Author
Animal Health Research Institute