
* 研究简报 *

嗜水气单胞菌胞外蛋白酶的检测

李焕荣* 陈怀青 陆承平** 夏德全

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

ASSAY OF EXTRACELLULAR PROTEASES (ECP_{ASE}) FROM *AEROMONAS HYDROPHILA*

Li Huanrong, Chen Huaiqing, Lu Chengping and Xia Dequan

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

关键词 嗜水气单胞菌, 胞外蛋白酶 54 (ECPase), 检测

Key words *Aeromonas hydrophila*, Extracellular protease 54 (ECPase), Assay

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* (Chester) Stanies)可产生各种致病因子^[1-3], 引致人和多种水生动物发病。胞外蛋白酶(Extracellular proteases, ECPase)即是其中之一。建立 ECPase 的快速、特异的检测方法非常必要。

1 材料与方法

1.1 菌株

本试验所用 40 株气单胞菌, 除有 1 株系从非养殖塘水分离外, 其他均为兽医及鱼病临床分离株, 有广泛的宿主地区代表。

1.2 ECPase 的制备与纯化

将培养 24h 的 Ah J-1 接种蔗糖胰蛋白胨培养基中, 25℃ 摇床(300rpm)培养 48h, 离心, 上清液经硫酸铵沉淀, DEAE-纤维素离子交换层析与 Sephadex G-200 分子筛层析, 获一纯化的 ECPase, 经 SDS-PAGE, 分子量约 54K, 取名为 Ah ECPase 54^[4]。

1.3 Ah ECPase54 抗体的制备

用经两次层析纯化的 Ah ECPase54 免疫 4 只小白鼠。免疫程序为: 初次免疫用灭活 Ah ECPase54 与弗氏完全佐剂, 而后用弗氏不完全佐剂取代弗氏完全佐剂, 14d 及 28d 两次强化免疫。每次均为腹腔注射, 蛋白含量均为 50μg / 只, 琼扩效价达 1:16 以上, 采用眼角穿刺法采血, 制备抗血清, 56℃ 灭活 30min, -20℃ 冷冻贮存备用。

* 现工作单位: 北京农学院牧医系, 北京 102206

** 通讯作者

1996 年 5 月 6 日收到。

1.4 Dot-ELISA 检测方法建立

参照有关文献 [5] 稍加改动, 进行蛋白酶 ELISA 试验。程序如下: 加 5 μ l 蛋白酶样品于硝酸纤维膜 (NC) 的光面, 37 $^{\circ}$ C 烘干。置封闭液中 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h, 洗涤 5 次, 每次 2min, 在 1:100 稀释的鼠抗 Ah. ECPase54 抗血清中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 同上洗涤。然后置于酶标羊抗鼠抗体中, 37 $^{\circ}$ C 1h 后洗涤, 于酶基质液 (DAB) 中显色, 待斑点出现后, 用去离子水洗涤, 终止反应。未接种细菌的肉汤作为阴性对照。

1.5 气单胞菌 ECPase 的检测

对 40 株气单胞菌分别用 4 种方法进行 ECPase 的测定。

1.5.1 脱脂奶琼脂平板法^[6] 将培养 24h 的细菌分别接种含 1% 脱脂奶的琼脂平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养, 观察溶蛋白圈的情况。

1.5.2 底物 (Azocasein) 检测法 按照 Allan 和 Stevenson 方法^[6] 稍加改动。将缓冲液 (0.05mol /L Tris-HCL, pH7.8, 1.15ml), 酶样品 (0.05ml), 底物 (10%, Azocasein, Sigma 公司产品, 0.05ml) 加到试管中混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 三氯乙酸 (10% TCA, W /V, 1.25ml) 中止反应, 室温再放 30min, 离心, 去沉淀, 等体积上清液和 1mol /L NaOH 混合, 显色, 分光光度计 OD₄₄₀ 波长测吸收值, 煮沸 10min 灭活的酶样品为空白对照。细菌培养时间 48h。

1.5.3 SDS-PAG 酪蛋白原位消化法^[7] 0.1% 酪蛋白直接加入 丙烯酰胺中聚合, 然后加 48h 培养的细菌上清液, 4 $^{\circ}$ C 下进行电泳, 用 2.5% 的 Triton X-100 浸泡凝胶 30min, 再置 37 $^{\circ}$ C 温箱中作用 1h, 考马斯亮兰染色, 观察无色清晰条带的情况。

1.5.4 Dot-ELISA 法 将摇床培养 48h 的 40 株气单胞菌的上清液, 分别加 5 μ l 于硝酸纤维 (NC) 膜的光面, 烘干, 封闭, 洗涤等步骤同 1.4。通过 Dot-ELISA 检测各菌株所产的蛋白酶, 以产生明显的斑点判为阳性, 阴性对照为未接种细菌的肉汤。

2 结果与讨论

用不同提纯过程中的 Ah ECPase 包被, 进行 Dot-ELISA 法检测, 可检测的 Ah ECPase 的 OD₄₄₀ 值分别为: 4h J-1 培养物上清液 0.027, 提纯的 Ah ECPase54 为 0.066 (表 1)。

表 1 Dot-ELISA 检测提纯各步骤的 Ah ECPase 54

Tab.1 Dot-ELISA detection of Ah ECPase54 in each step of purification

提纯步骤	酶活力(OD ₄₄₀)	稀释度 Dilution				可检测活力(OD ₄₄₀)
Step in purification	Activity of protease	0	10 ¹	10 ²	10 ³	Detectable activity
培养物上清液	0.069	+	+	-	-	0.027
Culture supernatant						
硫酸铵沉淀						
Precipitation by	0.236	+	+	+	-	0.015
Ammonium sulfate						
DEAE-cellulose						
Chromatography	0.666	+	+	+	+	0.069
Sephadex G200						
Filtration	0.570	+	+	+	-	0.066

将细菌接种含1%脱脂奶琼脂平板上,28℃培养24h后结果为,40株气单胞菌中,39株出现溶蛋白圈,仅1株阴性。细菌培养上清液与底物作用,测OD₄₉₀值,以Ah J-1株为标准,其中强性阳的有20株,中度阳性的4株,弱阳性的7株,其余OD₄₉₀值几乎为零。先加酪蛋白, PAG再聚合,电泳后37℃消化,染色。结果在所检测的17株气单胞菌中有14株可产生Ah ECPase54, NW, B-9及BH15例外(图1)。对40株气单胞菌的培养上清液进行Dot-ELISA检测,36株显阳性, Y₁₂₀, I₉₀₁₂₃, NW, B-9等4株显阴性结果。

嗜水气单胞菌的ECPase是一种致病因子^[6],其检测有助于判断所分离菌株是否有致病性,但对其检测方法缺乏系统的研究。本试验将脱脂奶琼脂平板法、底物法、SDS-PAG消化酪蛋白法及Dot-ELISA等4种方法同时用于气单胞菌ECPase的检测,尤其是所建立的Dot-ELISA法在国内外尚未见报道。此法可直接检测Ah ECPase54,简便快速,有实际应用前景。

脱脂奶琼脂平板法与底物法检测Ah ECPase均较方便,快速,但主观性强,特异性低。脱脂奶琼脂平板法的阳性率(97.5%)高于底物法(90%),两者符合率为92.5%。本试验建立的Dot-ELISA法特异性与敏感性均强于脱脂奶平板法和底物法;与脱脂奶琼脂平板法符合率达90%,与底物法符合率达97.5%。

在检测ECPase需加入酶作用的底物酪蛋白,进行SDS-PAG消化酪蛋白,可采用两种方法,一种是SDS-PAG原位消化法,另一种是SDS-PAG移位消化法。前者是在细菌上清电泳前直接将酪蛋白聚合在电泳胶中,而后者则是在细菌培养上清的粗提ECPase电泳后,另制含酪蛋白的琼脂板再移位消化。前者方法简便,可适用快速定性检测,后者分两步,方法略繁,需要酶量较多,但可借助标准分子量蛋白,与从底物作用的酶电泳带分析比较,确定其分子量。将两种方法结合起来,各有所得,且从另一角度证明了Dot-ELISA法特异性的正确。

本试验采用4种方法来检测ECPase的产生,旨在寻找简便,特异的检测方法。底物(Azocasein)法与脱脂奶法,主要是酪蛋白在起作用,是非特异的,可从SDS-PAG消化酪蛋白所出现的多条无色清晰带上得到证明。这说明凡是能消化酪蛋白的酶均可有此结果。SDS-PAG消化酪蛋白法因要借助于电泳而受温度、实验操作、酪蛋白含量等方面影响,且所消化清晰带也要以Ah ECPase54作对照判定哪条是此酶消化的结果,所以判断上可能有失误;而本试验建立的Dot-ELISA法,只需将Ah ECPase54免疫动物,制备抗血清,即可操作,方法简便,主观随意性小。Dot-ELISA法检测到NW, B-9, I₉₀₁₂₃这三株无Ah ECPase54产生,与SDS-PAG消化酪蛋白法结果基本相等,因此, Dot-ELISA法,不仅是在敏感性,还是特异性均优于SDS-PAG消化法,可用于快速、定性检测气单胞菌的致病因子Ah ECPase54,对判定菌株是否致病有一定作用。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



图1 SDS-PAGE 原位消化酪蛋白结果

Fig.1 Hydrolysis of casein by Ah ECPase in SDS-PAG in situ

1. Ah J-1 2. B-9 3. BH₁₀ 4. BH₁₁ 5. BH₁₂ 6. BF-10

7. LS-4 8. 4288 9. BSK-10 10. MF-1 11. TPS

12. Fm 13. NW 14. LL1/88 15. I292

16. F₁₅₅ 17. ATCC

箭头 arrow Ah ECPase 54

参 考 文 献

- [1] 涂小林, 陆承平. 嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析. 微生物学报, 1992, **32**: 432 — 438.
- [2] 严亚贤, 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌 S 蛋白提纯及其特性分析. 微生物学报, 1996, **36**(2): 144 — 150.
- [3] Thune, R. L. et al. Extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*: partial purification and effects on age-0 Channel catfish. *Transaction of the American Fisheries Society*, 1982, **111**: 749 — 754.
- [4] 李焕荣, 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶的纯化与特性分析. 南京农业大学学报, 1996, **19**(3): 88 — 94.
- [5] 陈怀青, 陆承平, 陈 琼, 涂小林. 用点酶法检测鱼类致病性嗜水气单胞菌 HEC 毒素. 动物检疫, 1993, **10**(4): 7 — 9.
- [6] Allan, B.J. and Stevenson, R. M. N., Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Canadian Journal of Microbiology*, 1981, **27**: 1114 — 1122.
- [7] Octavio Rivero, et al. Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serine protease gene from *Aeromonas hydrophila* *FEMS Microbiology Letters*, 1991, **81**: 1 — 8.
- [8] Nieto, T. R. & Ellis, A. E. Characterization of extracellular metallo- and serine- proteases of *Aeromonas hydrophila* strain B₃₁. *Journal of General Microbiology*, 1986, **132**: 1975 — 1979.