

斑点叉尾 源嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的特性研究

黄小丽¹ 汪开毓² 耿毅²

(1. 四川农业大学动物科技学院水产系, 雅安 625014; 2. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014)

摘要: 为了研究嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的酶学特性, 本实验检测了不同的修饰剂、温度、pH、EDTA 及 Ba^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 及 Mg^{2+} 等金属离子对酶活的影响, 结果表明 Ch-T、NBS 和 2-ME 能显著抑制酶活性, 而 N-AI、PM SF 和 PCM B 对酶活的影响不大, 说明蛋氨酸残基、色氨酸残基和二硫键是酶活性的必需基团, 而酪氨酸残基、丝氨酸残基和巯基与酶活性无直接关系。酶的最适温度为 20℃, 在 pH 为 9.0 时酶活最高, EDTA 能显著影响酶活性, Ca^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 能显著降低酶活性, 而 Co^{2+} 能使酶活增强, 证实该酶为一种金属蛋白酶。同时检测了该酶的致病性, 结果表明, 该酶对小鼠及斑点叉尾 具有明显的致死作用, 其 LD_{50} 分别为 4.33 μg/g 体重和 3.49 μg/g 体重。

关键词: 嗜麦芽寡养单胞菌; 胞外蛋白酶; 特性; 斑点叉尾

中图分类号: S941.429 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)06-0845-05

嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 是广泛存在于环境中的一种机会致病菌, 主要感染人, 可引起人类出血性肺炎, 败血症等^[1]。近年来发现, 该菌不仅感染人, 对陆生动物^[2]、植物^[3]及卵形鲳^[4]、闭壳龟^[5]和鳄鱼^[6]等在内的水生动物均可感染致病。我们于 2004 年首次发现该菌感染网箱养殖的斑点叉尾 , 相继在四川、重庆、贵州及湖北等地出现一种以后肠套叠和体表褪色斑为特征的嗜麦芽寡养单胞菌感染引起的大规模死亡^[7,8], 每年仅给四川斑点叉尾 养殖业就造成几百万的损失, 严重地威胁着斑点叉尾 养殖业的健康发展。弄清该菌的致病机理, 并制定相应的防治措施成了阻断该病继续发展的当务之急。但目前关于该菌的基础性研究还很少, 尤其是毒力因子的研究几乎处于空白阶段。有人报道该菌产多种胞外酶^[9], 其中胞外蛋白酶是主要的致病因子之一^[10,11]。而对于胞外蛋白酶的相关研究还很欠缺, 特别是其结构及性质方面的研究还很少涉足。本研究通过检测不同修饰剂对酶活的影响, 以及探测酶的最适温度、pH 和酶的致病性等酶学特性, 旨在为该酶的致病机理提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

苯甲基磺酰氟 (PM SF)、对-氯汞苯甲酸 (PG-MB) 为 Sigma 公司产品、N-乙咪唑 (N-AI) 为 Alfa 公司产品、2-巯基乙醇 (2-ME)、氯胺-T (Ch-T)、N-溴化琥珀亚胺 (NBS) 为北京化学试剂公司产品, 偶氮酪蛋白为厦门泰京生物公司产品。

1.2 方法

1.2.1 酶的提取 将保种的嗜麦芽寡养单胞菌接种于 TSB, 20℃ 120 r/min 振荡培养 48h, 菌液 4℃ 3000 r/min 离心 30min, 上清液用 70% 的饱和硫酸铵沉淀, 4℃ 盐析过夜, 4℃ 4000 r/min 离心 30min, 弃上清, 沉淀用 20mL 0.05mol/L pH 7.8 Tris-HCl 溶解, 4℃ 透析过夜。样品在室温 16—18℃ 下, 经 DEAE-Sephadex A50 层析后收集具有蛋白酶活的顶峰两管进行电泳, 得到一种分子量为 45.7kD 的单一多肽蛋白酶。

1.2.2 酶活的测定 参照 Allan 和 Stevenson 的方法稍加改进^[12]。以偶氮酪蛋白为底物 (5mg/mL, 用 0.05mol/L pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液配制), 在试剂中分别加入 0.05mol/L pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液

收稿日期: 2006-10-09 修订日期: 2007-07-04

基金项目: 农业部渔业局项目资助

作者简介: 黄小丽 (1979—), 女, 重庆人; 博士研究生; 主要从事水生动物病害方面的研究。E-mail: hxhlyq@126.com

通讯作者: 汪开毓, Tel 0835-2885753 E-mail: kywang@sicau.edu.cn

1. 15mL, 酶样品 0. 05mL, 偶氮酪蛋白 0. 05mL, 混匀, 30℃ 保温 30m in, 立即加入 5% 三氯醋酸 1. 25mL, 室温放置 20m in后, 4000r/m in离心 10m in, 取上清液 2mL与 2mL 1mol/L NaOH 混合, 于 440nm 处测定其 OD值, 以煮沸 10m in的酶液作空白对照。

1. 2. 3 酶分子量的测定与致病性研究 蛋白酶分子量的测定采用 SDS-PAGE电泳法, 浓缩胶 5%, 分离胶 12. 5%, 考马斯亮蓝 R-250染色。将纯化的蛋白酶用 0. 22 μ m 微孔滤膜除菌后, 用无菌 0. 05mol/L Tris-HCl 2倍梯度稀释后腹腔注射小鼠 (每只体重 (25 $\pm$ 2) g 购自四川大学华西动物试验中心)和斑点叉尾 (每尾 (50 $\pm$ 5) g 购自四川斑点叉尾 养殖基地), 每个稀释度注射 0. 5mL, 每组 10只 (尾), 观察记录 7d内死亡数, 记录症状及死亡率, 计算 LD₅₀。

1. 2. 4 酶的修饰^[13] 将不同浓度的修饰剂与提纯的蛋白酶在 30℃下共同作用 30m in, 分析残余酶活力。以蛋白质修饰剂的溶剂代替修饰剂, 在相同条件下与酶作用, 测定剩余酶活力, 以此酶活力作为 100%。

1. 2. 5 酶的性质研究 温度, pH、EDTA 及金属离子对酶活的影响参照 Herbert *et al.*^[14]的方法进行。以相同条件下未做处理的酶活作为 100%, 分析不同处理后的残余酶活力。

2 结 果

2. 1 酶的分子量及致病性

采用硫酸铵盐析, DEAE-Sephadex A 50层析, 并经 SDS-PAGE分析, 得到一分子量为 45. 7kD 的单一蛋白质。该蛋白具有明显的蛋白酶活性, 能在脱脂奶平板上形成明显的水解环, 且能显著降解偶氮酪蛋白, 能引起小鼠及斑点叉尾 较高的死亡率。将提纯的蛋白酶腹腔注射小鼠, 小鼠出现不同程度的死亡, 其 LD₅₀为 4. 33 μ g/g体重。将提纯的胞外蛋白酶腹腔注射健康斑点叉尾 后也出现不同程度死亡现象, 其 LD₅₀为 3. 49 μ g/g体重, 死亡鱼表现肝肾肿大, 实质细胞严重变性, 多出现液化性坏死现象。

2. 2 修饰剂对酶活的影响

从图 1可以看出, PMSF和 N-AI对酶活的影响不大, 而 Ch-T和 NBS能显著降低酶活。当 PMSF浓度高达 100mmol/L时, 相对酶活仍有对照的 94%, 故推测丝氨酸残基与该酶的活性中心无关, 其胞外蛋白酶不是一种丝氨酸蛋白酶。同样 N-AI对酶活也无明显影响, 与对照组相比, 酶活无明显降低, 当

N-AI的浓度达 100mmol/L时, 其剩余酶活力仍为对照组的 71. 9%, 说明酪氨酸残基与酶活性中心无关。氯胺-T (Ch-T)为蛋氨酸残基的常用化学修饰剂, 胞外蛋白酶与不同浓度 Ch-T反应后, 随修饰剂反应浓度的增加, 活力逐步丧失, 表明蛋氨酸残基与酶活性有密切关系。NBS的修饰对酶活力抑制作用明显, 当 NBS的浓度为 50mmol/L时, 其酶活完全丧失, 说明嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶中的色氨酸残基对该酶活性有重要的影响。2ME可明显抑制胞外蛋白酶活性, 当浓度达 100mmol/L时, 其相对酶活仅为对照组的 28%, 说明酶活性中心中有二硫键的存在。而 PCMB对酶活性的影响不大, 当其浓度达 100mmol/L时, 其剩余酶活力仍为对照组的 70%, 说明巯基与酶活性中心无关。

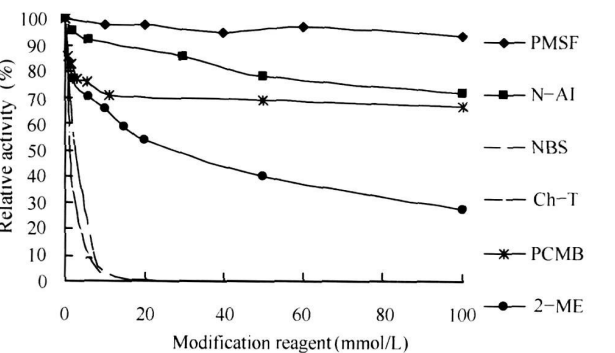


图 1 修饰剂 PMSF、Ch-T、NBS、N-AI、2-ME 和 PCMB 对胞外蛋白酶的影响

Fig. 1 The effect of PMSF, Ch-T, NBS, N-AI, 2-ME and PCMB on the extracellular protease activity of *S. maltophilia*

2. 3 嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的特性

2. 3. 1 温度对酶活的影响

由图 2和图 3可以看出, 温度对酶活影响较大, 20℃时酶活性达到最高, 此后酶活逐渐降低。酶在 50℃时作用 15m in, 其酶活降到对照组的 60%, 在 70℃作用 30m in, 其酶活仅为对照组的 11. 6%, 而当在 100℃下仅作用 15m in, 酶活几乎完全丧失。

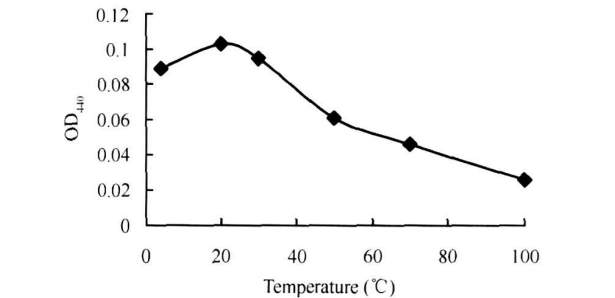


图 2 *S. m* 胞外蛋白酶的最适反应温度

Fig. 2 The effect of temperature on the activity of extracellular protease of *S. maltophilia*

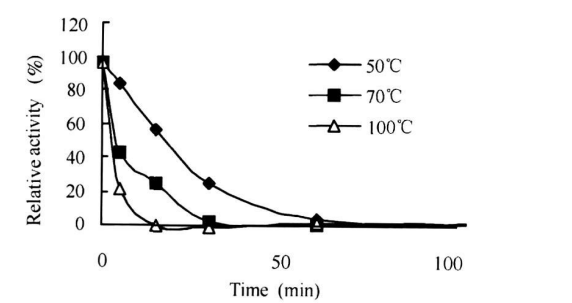


图 3 温度对 *S. m* 胞外蛋白酶稳定性的影响

Fig 3 The effect of temperature on the stability of extracellular protease of *S. m altophilia*

2.3.2 pH 值对酶活的影响

pH 对酶活的影响较明显。由图 4 可以看出, pH 偏碱性时酶活较高, 当 pH 达 9.0 时, 酶活达到最高, 此后酶活逐渐降低, 当 pH 为 13.0 时, 酶活性降到与 pH 3.0 时相当。

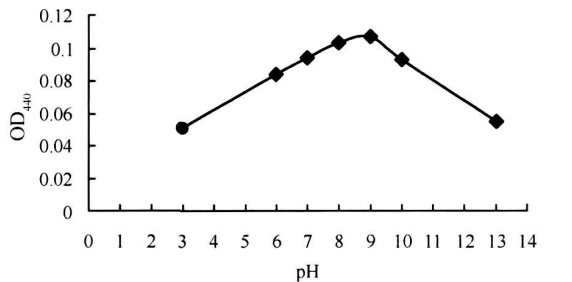


图 4 pH 对 *S. m* 胞外蛋白酶活性的影响

Fig 4 The effect of pH on the activity of extracellular protease of *S. m altophilia*

2.3.3 EDTA 对酶活的影响

从图 5 可以看出, 胞外蛋白酶经 EDTA 作用后酶活被明显抑制, 当 EDTA 浓度为 25mmol/L 时, 其酶活几乎完全丧失, 仅为对照组的 4.6%。这说明

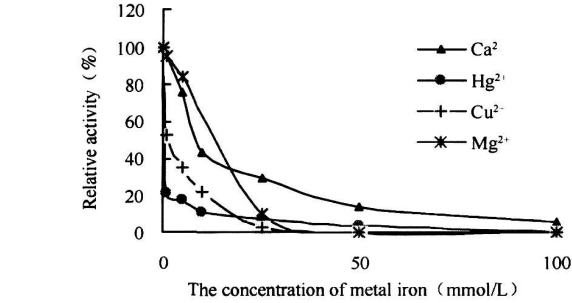


图 6 金属离子对 *S. m altophilia* 胞外蛋白酶活性的影响

Fig 6 The effect of metal ion on extracellular protease of *S. m altophilia*

嗜麦芽寡养单胞菌感染斑点叉尾 并导致大规模死亡是近两年才出现的一种现象。目前对其感染致病的机理研究还很少, Boethling R S *et al.* 从其

EDTA 与酶活性直接相关, 证实该酶为一种金属蛋白酶。

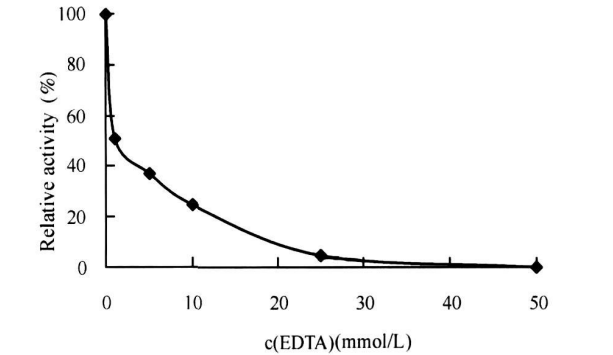


图 5 EDTA 对胞外蛋白酶酶活的影响

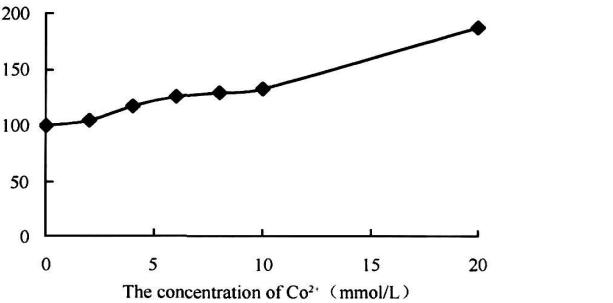
Fig 5 The effect of EDTA on the extracellular protease activity of *S. m altophilia*

2.3.4 不同金属离子对酶活的影响

不同金属离子对酶活的影响不同。Ba²⁺、Cd²⁺、Mn²⁺ 对酶活影响不大, Mg²⁺、Ca²⁺、Hg²⁺ 和 Cu²⁺ 能显著降低酶活性, 而 Co²⁺ 能使酶活性增强 (图 6)。

3 讨 论

多种水生动物病原菌均可产生胞外蛋白酶, 且具有明显的致病特性^[15-17]。嗜麦芽寡养单胞菌同样也能产生胞外蛋白酶, 且有研究证实胞外蛋白酶是其重要的致病因子^[18], 但关于胞外蛋白酶的特性还没有专门的研究报道。根据本试验结果可以看出, 嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶为一种金属蛋白酶, 酶的最适温度为 20℃, 最适 pH 为 9.0 对小鼠及斑点叉尾 具有明显的致死作用, 其 LD₅₀ 分别为 4.33μg/g 体重和 3.49μg/g 体重。



胞外产物中提纯了一种丝氨酸蛋白酶^[19], Sabine W indhorst 等也提纯了一分子量为 47kD 的蛋白酶, 经证实其为丝氨酸蛋白酶^[11]。蛋白酶按活性中心

分类一般分为丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶和金属离子蛋白酶^[20]。从本研究结果可以看出,本实验室所分离提纯的嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶不属于丝氨酸蛋白酶,因其不被 PMSF 所抑制。在众多所报道的酶中,约有三分之一的酶是金属酶或金属激活酶,需要有金属原子存在,酶才能充分表现其活性^[21]。而 EDTA 为金属螯合剂,可以与酶活性中心的金属离子发生作用,从而大幅度降低酶活性。嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶受 EDTA 的影响较大,故其为一种金属蛋白酶。这与前人所做的结果明显不同,究其原因,除提纯方法不同以外,可能与病原菌株的不同来源有很大关系。

酶能被 2-ME、Cl-T 和 NBS 所抑制,推测二硫键、蛋氨酸残基、赖氨酸残基为酶活性所必需,是酶活性的必需基团。而 N-AI、PCMB 对酶活性影响不明显,说明酪氨酸残基和巯基与其活性中心无关。但同时我们可以看出, N-AI、PCMB 可以轻微降低酶活性,这可能是由于修饰剂与酶活性中心以外的相应氨基酸残基相结合而改变了酶的空间构象,从而使酶活轻微降低。该结果与嗜水气单胞菌胞外蛋白酶的活性中心有很大差别^[22],说明不同水产动物病原菌所产生的胞外蛋白酶具有不同的结构和特性。

由嗜麦芽寡养单胞菌引起的斑点叉尾 疾病流行于每年 4—5 月,水温 17—25℃,随着温度的升高该病自动消失^[8]。从本试验结果可知,其胞外蛋白酶酶活的最适温度为 20℃,这与该病的流行温度一致,最适 pH 为 9.0。虽然生产上大部分养殖水体的 pH 值在 6.8—8.0 之间,但在该范围内胞外蛋白酶仍具有较高酶活,从而在特定季节内引起养殖斑点叉尾 的大规模发病死亡。

细菌分泌的蛋白酶也能够直接分解胶原蛋白、弹性蛋白以及纤连蛋白,从而导致多个组织的变性、坏死^[23]。本实验提纯的胞外蛋白酶对小鼠及斑点叉尾 具有明显的致死性,在感染发病的斑点叉尾 上表现为肝肾肿大,实质细胞的变性、坏死,这进一步证实了胞外蛋白酶在嗜麦芽寡养单胞菌的感染致病上起了很大的作用。另外 EDTA、Ca²⁺、Hg²⁺、Cu²⁺ 能显著降低酶活对指导生产用药有重要意义,弥补了该菌具有严重及广泛耐药性的缺点^[24]。

参考文献:

[1] Denton M, Kerr K G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, **11**(1): 57—80

[2] Johnson E H, Busaidy R, Haneed M S. An outbreak of lymphadenitis associated with *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* in Omani goats [J]. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 2003, **50**(2): 102—104

[3] Singh N I, Swings I J, Devi R K T, et al. White stripe, a new disease of rice caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in India [J]. *Indian Phytopathology*, 2001, **54**(2): 276

[4] Zhou Y C, Zhu W H. Isolation and prevention of the pathogen causing large scale death on *Trachinotus ovatus* [J]. *Marine Sciences*, 2001 (4): 40—44 [周永灿, 朱伟华. 卵形鲳 大规模个的病原及其防治. 海洋科学, 2001 (4): 40—44]

[5] Huang B, Chen S F. The study of cystic disease of *Cistoclonmys flacimarginata* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2002 (5): 44—46 [黄斌, 陈世峰. 黄缘闭壳龟囊肿病的研究. 淡水渔业, 2002 (5): 44—46]

[6] Harris N B, Rogers D G. Septicemia associated with *Stenotrophomonas maltophilia* in a west african dwarf crocodile (*Osteolemus tetraspis subsp. tetraspis*) [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, **13**(3): 255—258

[7] Geng Y, Wang K Y, Chen D F, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of one pathogenic bacterium associated from channel catfish [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, **46**(4): 28—31 [耿毅, 汪开毓, 陈德芳, 等. 斑点叉尾 一株致病菌的分离、鉴定与系统发育分析. 微生物学报, 2006, **46**(4): 28—31]

[8] Geng Y, Wang K Y, Huang X L, et al. A acute and fulminant bacterial pestilence of channel catfish [J]. *Scientific Fish Farming*, 2005 (3): 51—52 [耿毅, 汪开毓, 黄小丽, 等. 一种斑点叉尾 急性爆发性细菌性传染病初报. 科学养鱼, 2005, (3): 51—52]

[9] Arel M, Sylvestre M. Production of an extracellular ribonuclease by *Pseudomonas maltophilia* [J]. *Can J Microbiol*, 1979, **25**: 321—328

[10] Boethling R S. Regulation of extracellular protease secretion in *Pseudomonas maltophilia*. [J]. *J Bacteriol*, 1975, **123**: 954—961

[11] Sabine W, Eva F, Dessislava N, et al. The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(13): 11042—11049

[12] Allan B J, Stevenson R M N. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1981, **27**: 1114—1121

[13] Zhou H M, Wang H R. Themodification of protein [M]. Beijing: Qinghua University Publishing House, 1988, 19—49 [周海梦, 王洪睿. 蛋白质化学修饰. 北京: 清华大学出版社, 1988, 19—49]

[14] Herbert K, Brigitte R. Purification and partial characterization of Poliovirus protease 2A by means of a functional assay [J]. *Journal of Virology*, 1988, **62**: 1243—1250

[15] Shi C B, Hu X F, Chen X G, et al. Characteristics of the extracellular products of two pathogenic *Vibrio harveyi* strains [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(1): 83—87 [石存斌, 胡学峰,

- 陈献稿,等.两株致病性哈维氏弧菌胞外产物特性分析.水生生物学报,2007,31(1):83—87]
- [16] Mo Z L, Chen S Y, Zhang P J Properties of proteolytic toxin of *Vibrio anguillarum* from diseased flounder [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2002, 20(4): 316—322
- [17] Li H R, Chen H Q, Lu C P, et al Assay of extracellular proteases (ECPase) from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, 21(1): 97—100 [李焕荣,陈怀青,陆承平,等.嗜水气单胞菌胞外蛋白酶的检测.水生生物学报,1997,21(1):97—100]
- [18] Bottone E J, Reitano M, Janda J M, et al *Pseudomonas maltophilia* exoenzyme activity as a correlate in pathogenesis of ecthyma gangrenosum [J]. *J Clin Microbiol*, 1986, 24: 995—997
- [19] Boethling R S Purification and properties of a serine protease from *Pseudomonas maltophilia* [J]. *J Bacteriol*, 1975, 121: 933—941
- [20] Huang W T. The application handbook of enzyme [M]. Shanghai Shanghai Science and Technology Publishing House, 1989, 105 [黄文涛.酶应用手册.上海:上海科学技术出版社.1989,105]
- [21] Yuan Q S The modern enzymology [M]. Shanghai East China University of Science & Technology Publishing House, 2001, 79—87 [袁勤生.现代酶学.上海:华东理工大学出版社.2001,79—87]
- [22] Chu W H, Lu C P. Chemical modification of Extracellular protease of *Aeromonas Hydrophila* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 17(3): 372—375 [储卫华,陆承平.嗜水气单胞菌胞外蛋白酶的化学修饰.中国生物化学与分子生物学报,2001,17(3):372—375]
- [23] Chu W H. Ph. D. Thesis Invasion mechanism and extracellular protease of *Aeromonas Hydrophila* [D]. Nanjing Agricultural University, Nanjing, 2002, 31 [储卫华.博士论文,嗜水气单胞菌侵袭机制及其胞外蛋白酶的研究.南京农业大学,南京.2002,31]
- [24] Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 56: 20—51

THE CHARACTER OF EXTRACELLULAR PROTEASE OF *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* ISOLATED FROM *ICTALURUS PUNCTATUS*

HUANG Xiao-Li¹, WANG Kai-Yu² and GENG Yi²

(¹ Department of Fishery, Animal Science & Technology Department of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014

² College of Veterinary Medicine Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

Abstract Many researches reported that *Stenotrophomonas maltophilia* infected human in last twenty to thirty years, but we found it could make *Ictalurus punctatus* dead for the first time. Extracellular protease was one of the important pathogenic factors of *Stenotrophomonas maltophilia*. In order to investigate the character of extracellular protease and the optimal environment, the effects of protein modification reagents, temperature, pH and metal ion on the *S. maltophilia* extracellular protease activity had been studied. The protein modification of extracellular protease of *S. maltophilia* was studied with PMSF, PCMB, N-AI, Ch-T, NBS and 2-ME as the modification reagents. The results indicated that the protease was not affected by N-AI, PMSF and PCMB, but Ch-T, NBS and 2-ME could reduce the activity significantly. It implied that Ser, Tyr and sulfhydryl residues were not activity dependent groups, while Met, Trp and disulfide linkage groups played an important role on the activity of extracellular protease. Meanwhile we studied the effect of different environments on the protease activity. It showed that the optimal temperature was 20°C and the optimal pH was 9.0. PMSF could not affect the activity but EDTA, Ca²⁺, Hg²⁺ and Cu²⁺ could reduce the activity of protease greatly, however Co²⁺ could enhance the activity. It demonstrated that the protease was a metal-protease. Meanwhile, the purified protease was injected to rats and *Ictalurus punctatus* intraperitoneally, which came out a huge death. The LD₅₀ of extracellular protease to rats and *Ictalurus punctatus* were 4.33 μg/g and 3.49 μg/g respectively.

Key words *Stenotrophomonas maltophilia*; Extracellular protease; Character; *Ictalurus punctatus*