

1 种致病性鳃弧菌胞外蛋白酶的分离纯化及性质

陈吉祥, 刘 霜, 李 筠, 王祥红, 杜宗军, 于德华, 纪伟尚, 徐怀恕

(青岛海洋大学 海洋生命学院, 达尔文实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:从山东省莱州海区自然发病的花鲈(*Lateolabrax japonicus*)体内分离到1株致病性鳃弧菌,经硫酸铵盐析、DEAE-Sephadex Fast Flow 和 Sephadex-G100 凝胶层析等方法从其培养液中分离纯化了1种胞外蛋白酶。用 SDS-PAGE 电泳测得蛋白质的分子量为 36.7 kD, 酶的最适温度为 50 ℃, 对热不稳定, 70 ℃ 15 min 完全失去活力; 最适 pH 为 7.0; 1 mmol/L 的 PMSF 对酶活性无影响, 部分金属离子如 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 对酶活力有抑制作用, 而 Ca^{2+} 对酶有一定程度的激活作用, 1 mmol/L EDTA 能完全抑制酶的活性, 表明该酶是1种金属蛋白酶。

关键词:鳃弧菌; 胞外蛋白酶; 分离纯化; 理化性质

中图分类号: S941.42

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)04-0318-05

胞外蛋白酶被认为是许多细菌病原的毒力因子, 已从霍乱弧菌、创伤弧菌、嗜水气单胞菌等许多细菌病原中发现了胞外蛋白酶^[1-3]。Inamura 等^[4]从1株致病性鳃弧菌中部分纯化了1种胞外蛋白酶, 证明其对虹鳟、小鼠等有致死作用; Lamas^[5]利用鳃弧菌及其胞外蛋白产物对虹鳟进行腹腔注射后, 虹鳟表现出极为相似的症状。肖慧等^[6]从山东沿海养鱼场发病鱼的体内分离到1株致病性鳃弧菌, 感染实验表明该菌株对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)等海水养殖鱼类有较强的致病性, 常伴有严重的血管出血及组织损伤、出血等病症。本研究从其胞外产物中分离纯化了1种胞外蛋白酶, 并进行酶的理化性质研究, 以探讨该菌胞外产物对鱼类组织损伤及致病作用的机制。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

致病性菌株 W-1 分离自山东省莱州湾海区发病的花鲈(*Lateolabrax japonicus*), 经细菌形态学、

生理生化及 Biolog 系统鉴定为鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)。

1.2 试剂及仪器

DEAE-Sephadex Fast Flow、Sephadex-G100 购自 Pharmacia 公司, SDS、丙烯酰胺、牛血清蛋白、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、考马斯亮蓝 R-250、PMSF 等购自上海生物工程公司, 其余试剂为国产分析纯。蛋白层析系统购自上海沪西仪器厂, UV-730 紫外分光光度计购自日本岛津公司, DYY-III 垂直板电泳仪购自北京六一仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 细菌培养及胞外产物获得 细菌的培养用 2216E 海水液体培养基, 培养温度 28 ℃, 培养时间 24 h, 振荡频率为 180 r/min。培养物于 4 ℃ 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 再分别用 0.45 μm 和 0.20 μm 滤膜过滤, 滤液 -20 ℃ 保存备用。

1.3.2 酶的分离纯化

(1)硫酸铵盐析 将上述培养过滤液取出置室温融化后, 缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末至 80% 饱和度, 4 ℃ 过夜, 于 10 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, 并溶解于 40 mL 0.02 mol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液, 于 4 ℃ 条件下透析 24 h, 其间充分换水并搅动。最终体积 50 mL 左右。

(2)DEAE Sephadex Fast Flow 层析 将透析

收稿日期: 2001-11-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870581); 英国达尔文项目(162/8/065).

作者简介: 陈吉祥(1963-)男, 副研究员, 博士后, 从事海洋微生物学与免疫学。

液直接加入经 0.02 mol/L pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液平衡好的 DEAE-Sephadex Fast Flow 柱(1.0 cm × 15 cm), 用含 0~0.5 mol/L NaCl 的相同缓冲液梯度洗脱, 流速 24 mL/h, 每管 1 mL 收集洗脱液, 测定蛋白吸收和酶活力。

(3)Sephadex G-100 柱层析 将收集的上述酶溶液充分透析, 并用 PEG 浓缩至体积为 6 mL 左右, 然后加入到用 0.02 mol/L pH 7.8 Tris-HCl 平衡的 Sephadex G-100 柱(1 cm × 100 cm)。用相同缓冲液洗脱, 流速 15 mL/h, 每管 1 mL 收集洗脱液, 测定蛋白吸收和酶活力。收集酶活力集中部分, 冷冻干燥。

1.3.3 酶活力测定 参照 Inamura 方法^[4], 以偶氮酪蛋白为底物。具体方法为 0.5 mL 偶氮酪蛋白溶液(5 mg/mL, pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液配制), 加入 0.1 mL 酶溶液, 再加入 0.4 mL 双蒸水, 混匀后于 25 ℃ 保温 20 min。加入 5% 的三氯乙酸溶液 3.5 mL, 于室温 3 000 r/min 离心 5 min, 收集上清加入 0.5 mol/L NaOH 溶液 4.5 mL, 于 440 nm 测定其 OD 值。在该条件下 OD 值每增加 0.001 被定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.3.4 蛋白含量测定 蛋白质含量的测定按 Bradford 方法进行^[7], 以牛血清白蛋白为标准。

1.3.5 SDS-PAGE 电泳分析 蛋白酶的分子量测定采用 SDS-PAGE 垂直板电泳法: 浓缩胶浓度 3%, 分离胶浓度 10%, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 中分子量标准蛋白包括磷酸化酶 B、牛血清蛋白、卵清蛋白、羧肽酶、蛋清溶菌酶。

1.3.6 温度对酶活性的影响 按 1.3.3 方法在不同温度下测定酶活力, 确定酶的最适温度, 另外将蛋

白酶溶液于不同温度保温, 每隔 15 min 取样并迅速冷却到室温, 再测定酶的活力, 确定温度对酶活力影响。

1.3.7 pH 对酶活力的影响 分别以不同 pH 的缓冲液配制底物并稀释酶液, 再按 1.3.3 方法测定酶活力, 确定酶的最适 pH。

1.3.8 酶抑制剂及金属离子对酶活力影响 将各种酶抑制剂及金属离子分别加入到酶溶液中, 于 25 ℃ 保持 10 min, 再用常规方法测定酶活力, 并计算酶的活力剩余。

2 结果

2.1 鳃弧菌蛋白酶的分离纯化

鳃弧菌蛋白酶粗酶液经硫酸铵盐析后, 在 DEAE-Sephadex 柱层析中, 酶活力集中在第 2 峰, 在 Sephadex G100 柱层析中的酶活力集中于第 2 峰, 酶的分离纯化结果见表 1, 纯化后蛋白酶的比活性为 2.96×10^5 U/mg, 纯化倍数 4.42, 酶的收率为 25.23%。

2.2 酶的分子量测定

根据该酶在 SDS-PAGE 电泳中的迁移率, 通过作图法求得酶的分子量 36.7 kD(图 1)。

2.3 温度对酶活力的影响

该酶的最适反应温度为 50 ℃(图 2), 是一热不稳定酶, 温度较高时, 随时间延长, 活力部分丧失, 超过 70 ℃ 时 15 min 酶活力即完全丧失(图 3)。

2.4 pH 对酶活力的影响

该酶的最适 pH 为 7.0, pH < 4 时蛋白酶活力很低, 而在 pH 6~10 时蛋白酶较稳定(图 4)。

表 1 鳃弧菌胞外蛋白酶的纯化

Table 1 Purification of protease of *Vibrio anguillarum* W-1

纯化步骤 Purification process	体积/mL Volume	总活力/U Total activity	比活力/(U·mg ⁻¹) Specific activity	得率/% Yield rate	纯化倍数 Relative purification
培养过滤液 Culture filter	900.00	1.93×10^6	7.14×10^4	100.00	1.00
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate	50.00	1.26×10^6	9.66×10^4	62.64	1.35
DEAE-sephadex fast flow 柱层析 DEAE-sephadex fast flow	6.00	7.92×10^5	2.20×10^5	41.07	3.08
Sephadex G-100 层析 Sephadex G-100	28.00	4.97×10^5	2.96×10^5	25.23	4.42



图1 SDS-PAGE电泳测定鳗弧菌胞外蛋白酶的分子量

Fig. 1 Molecular weight analysis of protease from *V. anguillarum* by SDS-PAGE.

A. 标准分子量蛋白: 磷酸化酶 b(97 400), 牛血清白蛋白(66 200), 卵清蛋白(42 700), 碳酸酐酶(31 000), 溶菌酶(14 400); B. 鳗弧菌蛋白酶

A. Standard molecular weight proteins: Phosphorylase b(97 400), Bovine serum albumin (66 200), Ovalbumin b(42 700), Carbonic anhydrase (31 000), Lysozyme (14 400); B. Protease from *V. anguillarum*.

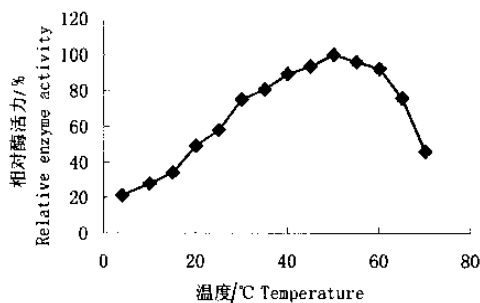


图2 鳗弧菌胞外蛋白酶的最适反应温度

Fig. 2 Optimum temperature of protease from *V. anguillarum*

2.5 酶抑制剂和金属离子对酶活力的影响

如表2所示, SDS可部分抑制酶的活力, 2 mol/L的Urea对酶活力影响不大, 而增加到8 mol/L时酶活力部分丧失; 1 mmol/L的PMSF对酶活力无影响, 1 mmol/L的EDTA完全抑制酶的活性。部分金属离子对该酶有一定的抑制作用, 其中 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 抑制作用较为明显, 而 Ca^{2+} 对酶有一定程度的激活作用(表3)。

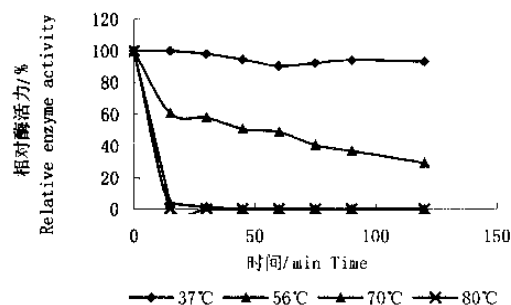


图3 温度对鳗弧菌胞外蛋白酶稳定性的影响

Fig. 3 Effects of temperature on stability of protease from *V. anguillarum*

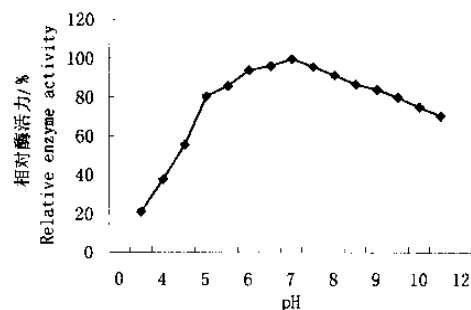


图4 鳗弧菌胞外蛋白酶的最适 pH

Fig. 4 Optimum pH of protease from *V. anguillarum* W-1

表2 抑制剂对鳗弧菌胞外蛋白酶的影响

Table 2 Effects of inhibitors on *V. anguillarum* W-1 protease

抑制剂 Inhibitor	浓度/ (mmol·L ⁻¹) Concentration	酶活力/ (U·ml ⁻¹) Enzyme activity	相对活力/% Relative activity	影响 Effect
对照 Control		9200	100.00	
EDTA	0.10	5950	64.67	—
	1.00	0	0.00	—
SDS	0.1	7350	79.89	—
	1.00	2650	28.80	—
Urea	2000	9200	100.00	
	8000	6950	75.54	
PMSF	0.10	9500	100.00	
	1.00	9500	100.00	

3 讨论

胞外蛋白酶被认为是许多细菌病原的毒力因子, 但不同的细菌所产生的胞外蛋白酶不同, 即使同一菌种的不同菌株其胞外蛋白酶也有一定的差异,

Miyoshi 等^[8]从创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)分离得到一种金属蛋白酶,其分子量为45 kD; Arnesen 等^[9]发现杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)的个别菌株胞外产物含有高分子量(89~100 kD)和低分子量(37 kD)的2类蛋白酶,而大部分菌株只有高分子量蛋白酶,提纯后的低分子量蛋白酶是一种金属蛋白酶,能被EDTA和过量的 Zn^{2+} 所抑制。Inamura 等^[4]从一株致病性鳃弧菌胞外产物中分离到的蛋白酶分子量为36 kD,该酶的最适pH为7~8,最适温度50℃,能被EDTA所抑制。Farrell 等^[10]通过硫酸铵盐析、DEAE-Sephacrose 层析、Sephacryl S-200 层析及DEAE 高效液相层析从鳃弧菌514分离纯化到分子量为38 kD和40 kD的2种蛋白酶,前者在pH中性偏碱的条件下保持最大活力,对丝氨酸、酪氨酸或酸性蛋白酶抑制剂不敏感,而被EDTA所抑制,属于金属蛋白酶。

表3 金属离子对鳃弧菌胞外蛋白酶的影响

Table 3 Effects of metal ions on *V. anguillarum* W-1 protease

抑制剂 Inhibitor	浓度/ (mmol·L ⁻¹) Concentration	酶活力/ (U·mL ⁻¹) Enzyme activity	相对活力/% Relative activity	影响 Effect
对照 Control		9200	100.00	
CaCl ₂	0.10	9550	103.26	+
	1.00	10600	115.00	+
ZnSO ₄	0.10	2750	29.85	-
	1.00	150	1.63	-
MgSO ₄	0.10	7900	85.87	-
	1.00	7550	82.06	-
FeSO ₄	0.10	7250	78.80	-
	1.00	3600	39.30	-
FeCl ₃	0.10	50	0.54	-
	1.00	1600	17.39	-
CuSO ₄	0.10	40	0.43	-
	1.00	0	0	-

本实验从鳃弧菌W-1培养液分离到的胞外蛋白酶分子量为36.7 kD,是一热不稳定性蛋白酶,丝氨酸蛋白酶抑制剂PMSF对该酶无抑制作用,1.0 mmol/L的EDTA能使酶活力完全丧失,说明该酶不属于丝氨酸蛋白酶类,而是一种金属蛋白酶;金属离子 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 等都对该酶具有抑制作用,而 Ca^{2+} 对酶有一定的激活作用,可能与活性部位金属离子的取代或位阻作用有关;在酸

性环境酶活力迅速丧失,在pH 6~10保持较高的酶活性,在碱性条件下酶活力较稳定,该金属蛋白酶与Farrell^[10]分离的低分子量组分相似。

各种胞外蛋白酶通过不同方式对宿主发生作用,如霍乱弧菌金属蛋白酶可破坏宿主细胞受体,切断和激活霍乱毒素A亚单位,并能降解肠粘膜以利于霍乱毒素的作用;创伤弧菌金属蛋白酶能通过降解基质膜IV型胶原蛋白引起溶血反应;嗜水气单胞菌胞外蛋白酶能引起鲫鱼的败血症症状^[11],有关鳃弧菌W-1胞外蛋白酶的作用,我们将另文报道。

参考文献:

- [1] Booth B A, Finkelstein M B, Finkelstein R A. *Vibrio cholerae* Soluble haemagglutinin/protease is a metalloenzyme [J]. Infect Immun, 1984, 42:639-644.
- [2] Miyoshi D L, Nakazawa H, Kawata K, et al. Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the hemolysin family [J]. Infect Immune, 1998, 66:4 851-4 855.
- [3] 李焕荣,陈怀青,陆承平,等.嗜水气单胞菌胞外蛋白酶EC-Pase54K的提纯及特性分析[J].南京农业大学学报,1996,19(3):88-94.
- [4] Inamura H, Nakai Tand Muroga K. An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1985, 51(2):1 915-1 920.
- [5] Lamas J, Santos Y, Devessa S, et al. A comparison of pathogenical changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Fish Pathology, 1994, 29:79-89.
- [6] 肖慧,李军,王祥红,等.鲈鱼苗烂尾病病原菌的研究[J].青岛海洋大学学报,1999,29(1):87-93.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72:248-254.
- [8] Miyoshi N, Shimizu C, Miyoshi S, et al. Purification and characterization of *Vibrio vulnificus* protease [J]. Microbiol Immunol, 1987, 31(3):13-25.
- [9] Arnesen A, Eggset G, Jørgensen T Ø. Partial purification and characterization of extracellular metalloproteases from *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* [J]. J Fish Dis, 1995, 18:283-295.
- [10] Farrell D H, Crosa J H. Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum* [J]. Biochemistry, 1991, 30:3 432-3 436.
- [11] 储卫平,陆承平.嗜水气单胞菌胞外蛋白酶对鲫鱼的致病性[J].南京农业大学学报,2000,23(2):80-84.

Purification of an extracellular protease from *Vibrio anguillarum* and its physicochemical properties

CHEN Ji-xiang, LIU Shuang, LI Yun, WANG Xiang-hong,

DU Zong-jun, YU De-hua, JI Wei-shang, XU Huai-shu

(Darwin Laboratory, College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: A strain of *Vibrio anguillarum* W-1 was isolated from the diseased seaperch (*Lateolabrax japonicus*) in Laizhou Bay, Shandong Province, and an extracellular protease was partially purified from the culture solution of the *V. anguillarum* by ammonium sulfate, DEAE-ephadex fast flow and Sephadex G-100. The results show that, the molecular weight of the purified enzyme from *V. anguillarum* by SDS-PAGE is 36.7 kD; the optimum temperature for the enzyme activity is 50 °C, and the enzyme is heatlabile that it would entirely lose its activity in 15 min at 70 °C; the optimum pH is 7.0; 1 mmol/L of EDTA and some metal ions (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}) can inhibit the enzyme activity, but Ca^{2+} is on the contrary that it can activate the enzyme to some extent. 1 mmol/L of PMSF has no effect on the enzyme, and the enzyme is suggested a kind of metalloprotease.

Key words: *Vibrio anguillarum*; extracellular protease; purification; physicochemical properties

中国水产科学研究院首席科学家简介

赵法箴 男, 1935年5月出生, 研究员, 中国工程院院士。海洋生物学家。现任中国水产科学研究院黄海水产研究所名誉所长, 农业部科学技术委员会委员, 中国水产学会副理事长, 全国政协委员。长期从事海水养殖、对虾养殖与实验生态研究。主持完成“对虾工厂化全人工育苗技术”研究, 获国家科学技术进步一等奖、世界知识产权组织金奖, 主持完成“对虾人工配合饵料研究”, 获国家科学技术进步二等奖。主持完成“中国对虾养殖综合防病技术”研究, 成果为国内领先水平, 为我国对虾养殖业的形成和大发展做出了突出贡献。获国家级有突出贡献中青年专家、山东省专业技术拔尖人才等荣誉称号。

夏德全 男, 1938年12月出生, 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心研究员, 博士生导师, 中国工程院院士, 中国水产学会副理事长。鱼类遗传育种学家。长期从事鱼类遗传育种研究, 先后获国家科技进步二等奖1项、三等奖2项, 农业部科技进步一等奖2项、二等奖2项、三等奖3项。通过高新技术与常规育种结合, 突破罗非鱼雄性化关键技术, 目前在全国30余省市养殖并形成产业。克隆鱼类目的基因, 构建了转基因团头鲂, 为鱼类育种开辟了新途径。1991年被授予农业部有突出贡献的中青年专家荣誉称号, 1997年获首届中华农业科教奖。发表论文60多篇, 培养研究生33名(其中博士生8名)。