

1 种可用于检测 WSSV 蛋白酶的微量酶活测定技术

刘庆慧, 黄 捷, 宋晓玲, 刘 莉

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘 要:以酪蛋白为底物,对常规蛋白酶检测方法进行改进并与偶氮酪蛋白法进行比较,建立适应病毒微量蛋白酶的快速检测方法。结果表明,改进的微量蛋白酶检测方法具有微量、快速、灵敏度高的特点,适于病毒微量蛋白酶的检测。蛋白酶的最低检出量可达 ng 级。

关键词:WSSV;微量测定;蛋白酶

中图分类号:Q556.9

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)02-0190-03

蛋白酶在病毒对细胞的入侵和在组织中的扩散过程中能起到重要的作用。常量蛋白酶的分析有较多的方法,但由于病毒蛋白酶量甚微,采用常规蛋白酶检测方法,难以满足微量的病毒蛋白酶的检测。Allan^[1]曾报道以偶氮酪蛋白为底物测定微量蛋白酶,本实验以酪蛋白为底物,对常规蛋白酶检测方法进行改进,并与偶氮酪蛋白法进行比较,建立适应病毒微量蛋白酶的快速检测方法,在此基础上对纯化的对虾白斑综合症病毒 WSSV 蛋白酶活性进行测定,以进一步研究 WSSV 蛋白酶在该病毒感染中的作用。

1 材料与方法

1.1 对虾 WSSV 的纯化

取 5 g 患白斑综合症的病虾经等量的 PPB^[2]中匀浆,经 7 000 r/min (RP65T-856, Hitachi) 离心 20 min (4 ℃),上清液铺于质量分数 35% 蔗糖垫层,25 000 r/min (RP65T-856) 离心 60 min (4 ℃),沉淀用 35% 蔗糖溶液重悬,上清液铺于 40%~65% 蔗糖梯度上,36 000 r/min (RPS65T-704) 离心 3 h (4 ℃),离心后取病毒区带用 PPB 稀释后,于 20 000 r/min (RP65T-856) 离心 60 min (4 ℃),沉淀用 0.4 mol/L NaCl 溶解,分装 100 μ l,冻存于 -76 ℃ 超低温冰箱中。

1.2 病毒蛋白浓度的测定

采用 Bradford 比色法^[3],以牛血清白蛋白为蛋白质标准,其中稀释液采用 0.4 mol/ml NaCl。

收稿日期:2001-12-10。

基金项目:国家重点基础研究项目资助(G1999012002)。

作者简介:刘庆慧(1962-),女,副研究员,从事水产利用化学、营养与生物化学方面研究。

1.3 微量蛋白酶活性测定方法的建立

1.3.1 测试方法 取质量分数 0.5% 酪蛋白(硼酸-硼砂缓冲液, pH 8.37) 50 μ l,加入 50 μ l 待测样品溶液,37 ℃ 恒温孵育 1~2 h,加 0.4 mol/L 的三氯醋酸 100 μ l,于 7 000 r/min 离心 10 min,取上清液 100 μ l,加 100 μ l Na₂CO₃ 和 50 μ l 福林试剂^[4],于 40 ℃ 显色 15 min,用酶标仪(Bio-Rad 550)在 96 孔板测 680 nm 的 OD 值,同时用 100 ℃ 加热灭活的样品代替待测样品作空白对照,并对不同的酪氨酸浓度进行测定以便作出标准曲线。

1.3.2 酶活定义 根据文献[4]方法,酶活的定义为特定温度时,每 mg 酶蛋白每 min 水解底物产生 1 μ g 酪氨酸为 1 个酶活单位。比活力 [μ g/(min·mg)] 为酶活除以酶蛋白浓度。

1.3.3 偶氮酪蛋白法 按 Allan 方法^[1],将胰蛋白酶溶于 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.8) 缓冲液中,10 mg 偶氮酪蛋白(Fluka)溶于 1 ml 重蒸水中。反应液为 50 μ l 酶液 + 50 μ l 偶氮酪蛋白底物液,恒温孵育后,加 100 μ l 三氯醋酸,室温放置 30 min,离心,取 200 μ l 上清液,加 200 μ l 1.0 mol/L NaOH,显色 15 min,用酶标仪测 440 nm 的 OD 值。

2 结果与讨论

2.1 底物量的确定

蛋白酶活性测定体系中,在蛋白酶量已知的情况下,确定合适的底物量对于蛋白酶活性检测的准确性非常重要。底物量较少,蛋白酶水解能力超过底物,使酶活曲线超出线性范围;底物量较大,易造成蛋白酶的过度稀释及底物浪费。为确定微量蛋白酶检测的底物量,本实验在 20 μ g/ml 的胰蛋白酶质量浓度下,设定了 3 种底物质量浓度进行蛋白酶活性测定。经方差分析,底物量为 100 μ l 和 200 μ l,酶活性检测 OD₆₈₀ 值无显著差异,而底物量为 50 μ l 和 100 μ l 时,酶活

性检测 OD_{680} 值有显著差异,据此确定底物加量以 $100\ \mu\text{l}$ 为宜(见表1)。

表1 底物量对蛋白酶活性测定的影响(OD_{680})

Table 1 Effects of substrate amount on protease activity

底物量/ μl Substrate amount	pH 8.37	pH 9.3
50	0.401 ± 0.01	0.392 ± 0.01
100	0.587 ± 0.02	0.579 ± 0.01
200	0.582 ± 0.02	0.580 ± 0.01

2.2 Na_2CO_3 浓度对微量蛋白酶测定体系的影响

酪氨酸在碱性条件下使福林试剂还原,生成蓝色化合物(钼蓝和钨蓝混合物),反应体系中加入 Na_2CO_3 以中和样品中的三氯醋酸,其量直接影响最终反应体系的酸碱度。若体系 pH 较低,酪氨酸不易被福林试剂还原生成蓝色化合物。图1显示 Na_2CO_3 浓度对微量蛋白酶测定体系的影响,表明 Na_2CO_3 浓度在 $0.6 \sim 0.8\ \text{mol/L}$ 为宜。

2.3 孵育时间对蛋白酶活性测定的影响

图2显示,在诱导初始阶段,OD值随诱导时间的延长而

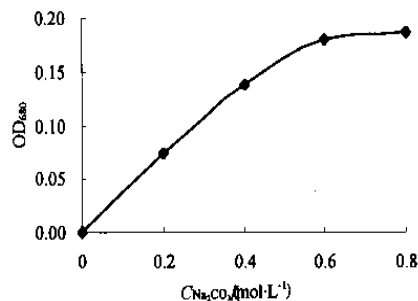


图1 Na_2CO_3 浓度对蛋白酶微量测定体系的影响

Fig.1 Effects of Na_2CO_3 concentrations on microanalysis of protease

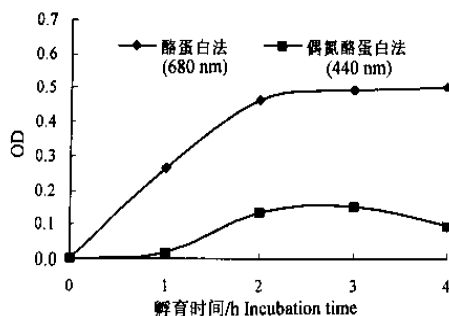


图2 孵育时间对胰蛋白酶水解酪蛋白的影响

Fig.2 Influences of incubation time on casei hydrolysis by trypsin

呈线性增加,当诱导时间至2 h,OD值变化趋于平缓,表明诱导初始阶段,胰蛋白酶对酪蛋白水解作用显著,水解作用一段时间后,胰蛋白酶对酪蛋白和偶氮酪蛋白的水解基本处于平衡,此时延长诱导时间,对酶活测定无意义。因此酶活性测定中应根据具体反应体系确定适宜的诱导时间,达到最佳酶活测定目的。

2.4 不同体系测定的比较

实验选用几种蛋白酶量,分别采用酪蛋白法和偶氮酪蛋白法为底物,对不同蛋白酶量孵育后酶活性变化进行测定,结果显示(图3),随酶量增加,酪蛋白法和偶氮酪蛋白法其OD值呈线性增加,其回归方程中相关系数分别为0.968 7和0.931 7,说明2种方法在酶量 $50 \sim 400\ \text{ng}$ 时均较好地符合线性关系,但曲线斜率分别为0.001 5和0.000 2,说明前者的灵敏度较后者高7.5倍。对应同一数量级的蛋白酶,酪蛋白法测定的OD值显著高于偶氮酪蛋白法,故前者的测定结果具有较高的灵敏度。

2.5 对虾WSSV蛋白酶活性初步测定

从患病对虾的鳃组织中经蔗糖密度梯度纯化的WSSV,采用上述反应体系,分别在pH 7.5和pH 9.5测定其蛋白酶OD值,根据图4酪氨酸与OD值的关系曲线,换算出酪氨酸的量并计算酶活。从表2测定结果可以初步确定纯化病毒

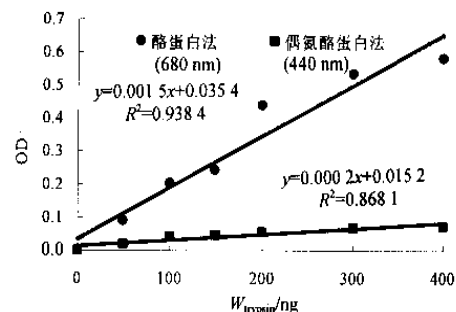


图3 不同胰蛋白酶量水解效果

Fig.3 Hydrolysis of casein by different amount of trypsin

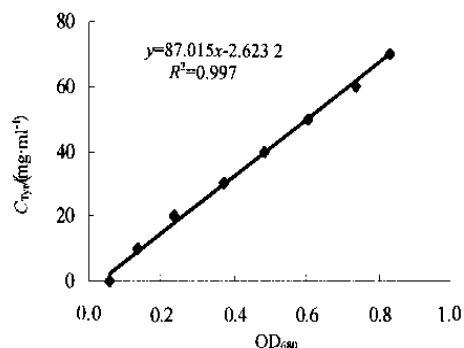


图4 酪氨酸与 OD_{680} 的关系(标准曲线)

Fig.4 Relation between Tyr concentration and OD_{680}

液中有蛋白酶存在,并且 pH 对蛋白酶活性有明显的影响。对同一样品重复测定 4 次,分析结果的相对标准偏差分别为 6.2% 和 0.93%,说明该测定方法的精度较高,适用于病毒的微量蛋白酶活性的测定。有关 WSSV 病毒蛋白酶的研究将另文发表。

表 2 对虾病毒蛋白酶活性初步测定结果(37℃)

Table 2 Results of virus protease activity (VPA) in shrimp

项目 Item	缓冲液 pH Buffer pH	
	9.5	7.5
OD	0.059 ± 0.02	0.125 ± 0.04
病毒蛋白浓度/(mg·ml ⁻¹)VPA	0.242	0.242
酶活 Protease activity	0.357 1	3.511 2
比活 Specific activity	1.476	14.52
相对标准偏差 RSD	6.2%	0.93%

3 结语

常量蛋白酶测定由于取样量大,难以满足病毒微量蛋白

酶研究的要求。本实验在常规蛋白酶检测基础上,缩减取样量,并研究适宜的底物量以及碱液浓度对测定体系的影响,优选出的微量蛋白酶测定体系对微量的酶活具有较好的线性关系。由于采用 96 孔板,1 次可同时进行多个样品的测定,使测定过程得到简化,还避免了因样品显色时间不一致而导致的误差。这对进行病毒微量蛋白酶性质的进一步研究尤为重要。

参考文献:

- [1] Allan B J, Stevenson R M N. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections[J]. Can J Microbiol, 1981, 27: 1 114 - 1 122.
- [2] Huang J, Song X-L, Yu J, et al. The components of an inorganic physiological buffer for *Penaeus chinensis* [J]. Methods in Cell Sci, 1999, 21: 225 - 230.
- [3] 奥斯伯, 布伦特 R. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [4] 周晓云. 酶技术[M]. 北京: 石油工业出版社, 1995.

A technique for detection of micro-protease of WSSV

LIU Qing-hui, HUANG Jie, SONG Xiao-ling, LIU Li

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: By comparison with N, N-casein substrate, a quick detection method for WSSV micro-protease was set up using casein as a substrate. The results show that the improved method for micro-protease detecting has the advantages of being micro, quick and highly sensitive. The lowest detectable level for protease can reach 10⁻⁹g.

Key words: WSSV; micro-detection; protease