

哈维氏弧菌 TS-628 菌株胞外产物(ECP)蛋白酶活性的研究

覃映雪^{1,2} 苏永全^{2*} 陈雅芳² 王 军²

(¹集美大学水产学院,厦门 361021)

(²厦门大学海洋系,亚热带海洋研究所,361005)

摘要 采用复性电泳技术,研究环境 pH、温度及培养时间对哈维氏弧菌 TS-628 菌株胞外产物(ECP)蛋白酶活性的影响。结果表明,胞外产物蛋白酶最适反应 pH 在 8.5 左右,酸对 ECP 蛋白酶活性的抑制明显强于碱对它的抑制作用;最适反应温度在 20~50 之间,20 以下或 50 以上蛋白酶活性则受到明显抑制,表明蛋白酶不仅对高温敏感,对低温也很敏感;培养 12 h 的胞外产物蛋白酶活性最强。最适温度和 pH 条件下,主要出现 3 种蛋白酶,其中分子量为 94 kDa 和 26 kDa 的两种蛋白显示了很强的蛋白酶活性,而且能在比较极端的温度和 pH 值条件下保持活性,而分子量为 35 kDa 蛋白酶只在最适反应条件下出现,并且该蛋白酶的最适反应条件与弧菌病暴发时的环境条件极为相似。由此可推测分子量 94 kDa 和分子量为 26 kDa 的两种蛋白可能是弧菌维持生存所必需,而分子量为 35 kDa 的蛋白酶虽然只出现在特定条件下,却可能在致病过程中起重要作用。

关键词 哈维氏弧菌 胞外产物 蛋白酶

中图分类号 S917.1

文献标识码 A

文章编号 1000-7075(2008)01-0081-05

Study on protease activities of the ECP of pathogenic bacterium *Vibrio harveyi* strain TS-628

QIN Ying-xue^{1,2} SU Yong-quan^{2*} CHEN Ya-fang² WANG Jun²

(¹ Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021)

(² Department of Oceanography, Institute of Subtropic Ocean, Xiamen University, 361005)

ABSTRACT SDS-gelatin-PAGE assay was used to study the effects of pH, temperatures, and growing time on the protease activities of the extracellular products (ECP) of *Vibrio harveyi* TS-628 strain. The results showed that the optimal pH for ECP protease activity was about 8.5 and the protease activity was inhibited more easily by lower values of pH than by higher ones. The optimal temperature for the protease was 20~50, and significant decrease in activity was observed at temperatures below 20 or above 50, which indicated that the protease was sensitive to both low and high temperatures. The highest level of the extracellular product protease activity was present after 12h incubation. Under the condition of optimal temperatures

福建省青年科技人才创新基金项目(2006F3096)和集美大学科研项目共同资助

*通讯作者。E-mail: yqsu@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期:2007-03-03;接受日期:2007-06-29

作者简介:覃映雪(1976-),女,博士,主要从事水产病害微生物研究。E-mail: Yingxue_qin@163.com, Tel: (0592) 6180204

and pH, there were three kinds of protease present: 94kDa, 26kDa and 35kDa. The 94kDa and 26kDa proteases displayed high activity and could remain active under extreme temperatures and pH, while the 35kDa protease was only active under the optimal condition, which was similar to the condition for the outburst of pathogenic vibrio. It is suggested that the 94kDa and 26kDa proteases were necessary in maintaining the vibrio survival and the 35kDa protease could play an important role in the pathogenicity of the bacteria.

KEY WORDS *Vibrio harveyi* Extracellular products Protease

胞外产物(ECP)是致病菌在生长繁殖过程中释放出的代谢产物,是侵染机体的主要成分之一。ECP可以抵抗宿主免疫因子的作用,分解破坏宿主机体的组织成分,有利于其他病原的进一步侵染;还可以破坏机体血淋巴中凝血系统的酶活性,破坏血细胞,影响其功能发挥,并导致溶血现象的发生等等,因此 ECP 成为决定病原菌毒力的重要因素之一。

ECP 的致病成分主要有蛋白酶、溶血素、肠毒素、细胞毒素等等。致病性弧菌能产生多种蛋白酶,主要有半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、弹性蛋白酶、胶原蛋白酶、明胶酶等等(吴后波等 2003)。蛋白酶的活性对病原菌的致病性具有重要作用,而且已在多种鱼、虾的病原弧菌中发现具有强烈致病作用的胞外蛋白酶。哈维氏弧菌是水产养殖中常见的条件致病菌(Austin *et al.* 2006),关于其胞外产物蛋白酶的研究也有零星报道(Fukasawa *et al.* 1988a, b; Liu *et al.* 1997; Lee *et al.* 1995; Zhang *et al.* 2000),但研究结果往往因人而异,说明 ECP 蛋白酶受多种因子影响,不同来源菌株的蛋白酶生化性质各不相同,因此有必要对所分离到的哈维氏弧菌 TS-628 菌株的 EPC 蛋白酶的生物活性及影响因子进行研究,以探寻蛋白酶与病原菌致病性之间的关系。

复性电泳法也称明胶原位消化法,它是 20 世纪 70 年代初建立起来的一种电泳技术,该技术的特点是在丙烯酰胺胶液中加入易为蛋白酶水解的明胶,明胶在电泳过程中不发生位移,而蛋白酶与 SDS 结合发生可逆变性,电泳完毕后用 TritonX-100 等非离子去垢剂去除 SDS 恢复蛋白酶活性,经过适当温育,考马斯亮兰 R250 染色后在无蛋白酶作用的地方胶被染成兰色,而有蛋白酶作用的地方胶呈现无色透明区,透明区的位置可反映蛋白酶的等电点和相对分子量,而透明区的大小和透光度可反映酶的活性强弱(Heussen *et al.* 1980)。这种技术已经在动植物发育和衰亡过程蛋白酶活性变化的研究中得到广泛应用(Jiang *et al.* 1999; Paul 1998; 张胜新等 1997),但在有关细菌蛋白酶活性研究方面还鲜有报道。

本试验以养殖青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 溃疡病分离的细菌性病原哈维氏弧菌 TS-628 株为对象,尝试采用复性电泳技术,研究环境 pH 值、温度及培养时间对该菌胞外产物蛋白酶活性的影响,为探索弧菌的致病机制提供理论基础,并探寻防治弧菌病的有效措施。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验菌株

哈维氏弧菌 TS-628 菌株于 2002 年由本实验室从患溃疡病的青石斑鱼分离保存(Qin *et al.* 2006)。

1.1.2 主要试剂

培养基为胰大豆胨琼脂(TSA)和胰大豆胨肉汤(TSB)(北京陆桥医学生物技术公司),配制时 NaCl 含量加至 20%。丙稀酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)等主要生化试剂均为 BBI 公司产品,其他常规化学试剂为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 胞外产物的制备

菌种接种 TSB 培养基,30℃ 培养 24 h 后离心收集菌体,无菌 PBS(pH7.2)反复洗涤菌体 3 次,最后将

PBS 稀释的菌悬液均匀涂布于表面覆盖着灭菌玻璃纸的 TSA 平板上,30 ℃ 培养,培养 12、24、36、48、60 和 72 h 后分别收集样品。用适量无菌 PBS 悬浮玻璃纸上的细菌及其分泌物,并将其收集到 1.5 ml 离心管中,25 000 g 4 ℃ 离心 60 min,收集上清液用 0.22 μm 滤纸过滤,Bradford 方法测定蛋白含量后小量分装置 - 20 ℃ 备用。

1.2.2 胞外产物的复性电泳

1.2.2.1 pH 对哈维氏弧菌 TS-628 胞外产物蛋白酶活性的影响

参照有关文献 (Zhang *et al.* 2000; Heussen *et al.* 1980; Jiang *et al.* 1999; Paul *et al.* 1998) 并稍作改进。具体如下:电泳采用 5% 的积层胶、10% 分离胶,制备分离胶时加入 0.1% 的明胶作为底物。哈维氏弧菌 TS-628 培养 36 h 的胞外产物样品与等体积非变性上样缓冲液混合,室温下静置 10 min 后上样,每个上样孔加入 4.5 μg 样品。电泳采用 Bio-Rad 公司 mini-PROTEAN II™ 装置,在 4 ℃ 下 50V 预电泳 15 min 后 100 V 恒压电泳 2 h。电泳完毕,用复性缓冲液漂洗凝胶两次,每次 15 min。然后将凝胶按泳道切割成大小相仿的胶条,置于 pH 分别为 4、6、7、8.5 和 10 的反应缓冲液中,35 ℃ 温育 3 h。染色液染色 30 min,脱色液脱色至透明区域清晰透亮。同样条件下制备不含明胶的聚丙烯酰胺凝胶,同时进行电泳、染色和脱色,根据蛋白质 Marker 的分子量计算出蛋白酶的大致分子量。

1.2.2.2 温度对哈维氏弧菌 TS-628 胞外产物蛋白酶活性的影响

方法基本同 1.2.2.1,但反应缓冲的 pH 值固定为 7,反应温度分别为 4、10、20、30、50、60、80 和 100 ℃。

1.2.2.3 培养时间对哈维氏弧菌 TS-628 胞外产物蛋白酶活性的影响

电泳样品为经过 12、24、36、48、60 和 72 h 培养的胞外产物,上样量都是 4μg,反应温度为 35 ℃,反应缓冲液 pH 为 7,其余同 1.2.2.1。

2 结果

2.1 pH 对哈维氏弧菌 TS-628 胞外产物蛋白酶活性的影响

从图 1 可以看出:一种分子量约为 94kDa 的大分子蛋白酶的活性在 pH 高于或低于 8.5 时都有所减弱,变化并不强烈;另一种为分子量约为 35kDa,这种蛋白酶的活性相对较弱,而且对 pH 极其敏感,只出现在 pH 7~8.5 的范围内,过酸或过碱则消失;还有一种分子量约为 26kDa 的蛋白酶,这种蛋白酶活性很强,尤其是在反应缓冲液为最适 pH 即 pH=8.5 时,表现出的透明区范围最大,它对 pH 有一定的敏感度,在 pH 低于或高于 8.5 时蛋白酶的活性都受到抑制,并在反应 pH=4 时几乎完全消失。

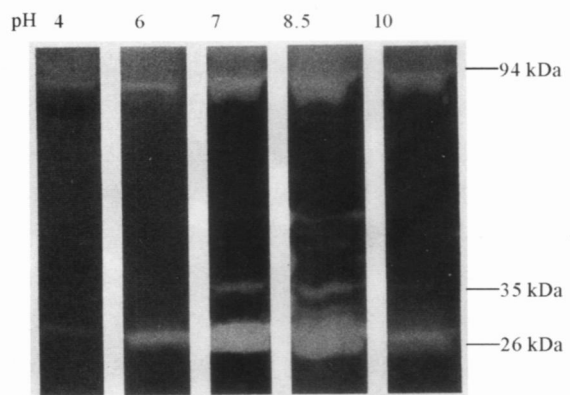


图 1 pH 对病原菌胞外产物蛋白酶活性的影响
Fig. 1 Effect of the incubation buffer pH on the protease activity of extracellular products

2.2 温度对哈维氏弧菌 TS-628 胞外产物蛋白酶活性的影响

由图 2 也可以看到哈维氏弧菌胞外产物中 3 种主要的蛋白酶,温度对分子量 94kDa 的大分子蛋白酶的影响较 pH 对它的影响明显,最适反应温度在 30~50 ℃ 之间,低于 30 ℃ 或高于 50 ℃ 蛋白酶活性受到抑制,而且该酶对高温的耐受性强于对低温的耐受性,100 ℃ 下温育 3h 仍保持一定的活性,而在 4 ℃ 下活性完全消失;分子量为 35kDa 的蛋白酶对温度也非常敏感,只出现在 20~50 ℃ 的温度范围内;而分子量为 26kDa 的蛋白酶的最适反应温度是 30~50 ℃,随着温度的升高或降低,该酶所处位置出现的透明区逐渐缩小,透明度逐渐减弱。

2.3 培养时间对哈维氏弧菌 TS-628 胞外产物蛋白酶活性的影响

如图 3 所示,培养时间长短对哈维氏弧菌蛋白酶种类和活性的影响较为显著。大体而言,所有样品中 12 h 培养的胞外产物蛋白酶活性最强,随着培养时间增加蛋白酶活性有逐渐下降的趋势,但培养时间达 60h 蛋白酶活性有所回升。

就蛋白酶的种类而言,分子量为 94kDa 的大分子蛋白酶和分子量约为 26kDa 的蛋白酶为所有样品所共有,其中 94kDa 大分子蛋白酶的活性随培养时间的增长逐渐减弱;26kDa 的蛋白酶活性则是在 36h 出现明显下降,之后培养时间增加对其活性影响不太明显。而 35kDa 的蛋白酶在 12 和 24h 样品中没有出现,在 36h 中出现后随培养时间增长活性有逐渐增强的趋势。在 12 和 24h 样品中还出现两条大致分子量分别为 41kDa 和 50kDa 的蛋白酶,培养 12h 这两种蛋白酶都显示很强的活性,到 36h 两种蛋白酶几乎全部消失。另外,一种大分子量约为 42kDa 的蛋白在 60h 样品中开始出现,72h 该酶活性略有升高;还有一种分子量约为 44kDa 的蛋白酶则是在 72h 才出现。

3 讨论

大量研究证明致病菌的蛋白酶与病原菌对宿主的入侵、损害及致死等机制紧密相关,因此对致病菌蛋白酶的研究已成为病害研究的热点。早期对哈维氏弧菌胞外蛋白酶的研究发现,不同菌株纯化得到的胞外产物蛋白酶并不相同。如从哈维氏弧菌 FLA-11 菌株纯化得到的蛋白酶是一个四聚体,分子量为 84kDa,在 pH8.0 和 55 条件下显示最大活性,在 40 以下活性稳定。试验证明,该蛋白酶是一种对金属螯合剂敏感的碱性蛋白酶(Fukasawa *et al.* 1988a);而另一株哈维氏弧菌 FLN-108 则纯化得到两种对金属螯合剂敏感的碱性蛋白酶,分别为 49kDa 和 46kDa 的二聚体,在 pH8.0 ~ 9.0 和 50 条件下显示最大活性,在 45 下活性稳定(Fukasawa *et al.* 1988b)。Liu 等(1997)纯化哈维氏弧菌 820514 菌株得到的胞外产物蛋白酶则是一种半胱氨酸蛋白酶,大致分子量为 38kDa,经 24 h 培养的蛋白酶产物最大活性出现在 pH8.0 和 50 的条件下,与 Fukasawa 的研究结果有相似的地方。Saeed(1995)则发现培养 36 h 的哈维氏弧菌胞外产物的蛋白酶活性和溶血活性最强,而 Zhang 和 Austin(2000)则认为哈维氏弧菌胞外产物的毒性与培养基及培养基中 NaCl 的浓度有关,对试验虹鳉 *Oncorhynchus mykiss* 毒性最强的是在 NaCl 的浓度为 1% 的胰大豆胨琼脂(TSA)培养基上培养 24h 的胞外产物,该产物具有最强的酪蛋白酶活性。

综合前人的研究发现,不同学者所发现的哈维氏弧菌胞外产物蛋白酶的种类及生化性质不尽相同,主要是与弧菌的来源和生长环境密切相关。在本研究中哈维氏弧菌 TS-628 菌株的蛋白酶组成因培养时间不同而有所变化,但最适反应 pH 在 8.5 左右,酸对 ECP 蛋白酶活性的抑制明显强于碱对它的抑制作用;最适反应温度在 20~50 之间,20 以下或 50 以上蛋白酶活性则受到明显抑制;12h 培养的胞外产物蛋白酶活性最强,之后随着培养时间的增加蛋白酶活性有逐渐下降的趋势,但培养时间达 60h 蛋白酶活性有所回升。本研究的菌株哈维氏弧菌 TS-628 源自厦门同安湾患病青石斑。同安湾地处亚热带海区,夏季特别是在持续高温炎热

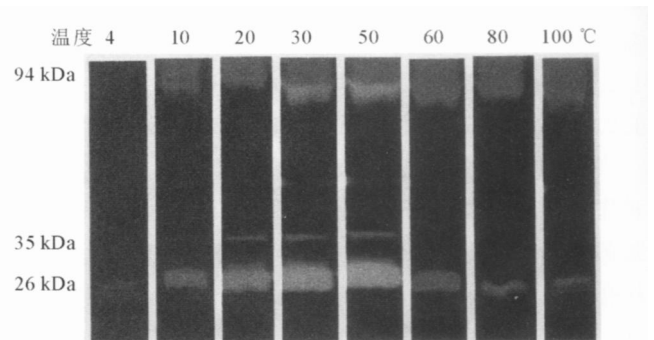


图 2 pH 为 7 的条件下温度对病原菌胞外产物蛋白酶活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the protease activity at pH 7

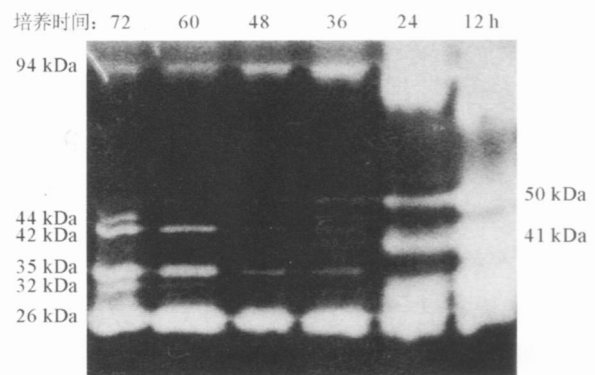


图 3 培养时间对胞外产物蛋白酶活性的影响

Fig. 3 Effect of culture time on the protease activity

的气候下,海水的表层水温有时可达 30 以上;同时海洋又是一个巨大的缓冲体系,它的 pH 值偏碱性,一般保持在 7.5~8.4 之间,高温干旱的天气海水 pH 值略有升高,而低温或多雨的天气海水 pH 值则有所下降。海区的这些水文特征与病原菌蛋白酶的最适反应条件接近,这大概也是哈维氏弧菌引发的溃疡病易在高温、干旱的气候条件下暴发,而在大量降雨气温下降之后病害得到缓解的原因之一。另外,最适温度和 pH 条件下,主要出现 3 种蛋白酶,其中分子量为 94kDa 和 26kDa 的两种蛋白酶显示了很强的活性,而且能在比较极端的温度和 pH 值条件下保持活性,而分子量为 35kDa 的蛋白酶只在最适反应条件下才出现,而且它的最适条件与病害暴发时的环境条件极其相似。由此可推测分子量 94kDa 和 26kDa 的两种蛋白酶可能是弧菌维持生长繁殖所必需,而分子量为 35kDa 的蛋白酶虽然只出现在最适条件下,却可能在病原菌的致病性中起重要作用。

总之,通过对哈维氏弧菌 TS-628 菌株胞外产物蛋白酶活性的研究发现,在适宜环境条件下其胞外产物蛋白酶具有很强的生物活性。另外,哈维氏弧菌胞外产物蛋白酶的种类至少 3 种以上,而且种类随培养时间长短不同而有所变化,环境 pH、温度和培养时间对各种蛋白酶活性都有不同程度的影响。可以推测,哈维氏弧菌胞外产物蛋白酶在该菌的致病过程中具有重要作用,但其对鱼类的致死浓度及致病机理还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 吴后波,潘金培. 2003. 病原弧菌的致病机理. 水生生物学报, 27(4):422~426
- 张胜新,李金亭,徐存拴. 1997. 小白鼠发育过程中小肠蛋白酶活性变化的研究. 动物学报, 43(增刊):102~106
- Austin, B., and Zhang, X. H. 2006. *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Letters in Applied Microbiology, 43:119-124
- Fukasawa, S., Nakamura, K., Kami, A., Ohyama, Y., and Osumi, M. 1988a. Purification and properties of a proteinase from a luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLA-11. Agric. Bio. Chem. 52:435~441
- Fukasawa, S., Nakamura, K., Miyahira, M., and Kurata, M. 1988b. Some properties of two proteinases from a luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLN-108. Agric. Bio. Chem. 52:3009~3014
- Liu, P. C., Lee, K. K., Tu, C. C., and Chen, S. N. 1997. Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. Curr. Microbiol. 35:32~39
- Lee, K. K., Chen, Y. L., and Liu, P. C. 1995. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and a toxic cysteine protease. Blood Cell, Molecules, and Diseases, 25(13):180~192
- Zhang, X. H., and Austin, B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. Journal of Fish Diseases, 23:93~102
- Heussen, C., and Dowdle, E. B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Analytical Biochem. 102:196~202
- Jiang, W., Lers, A., Lomaniec, E., and Aharoni, N. 1999. Senescence-related serine protease in parsley. Phytochemistry, 50:377~382
- Paul, S., and Bernard, R. 1998. Characterization of proteolytic activity during senescence in daylilies. Physiologia Plantarum, 104:463~473
- Qin, Y. X., Wang, J., Su, Y. Q., Wang, D. X., and Chen, X. Z. 2006. Studies on the pathogenic bacterium of ulcer disease in *Epinephelus awoara*. Acta Oceanologica Sinica, 25(1):154~159
- Saeed, M. O. 1995. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. Aquaculture, 136:21~29