

脱脂奶溶蛋白琼脂扩散试验检测 AhECP*

朱杰青 吉传义 陆承平**

(南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘要: 建立了脱脂奶溶蛋白琼脂扩散试验新方法,用于检测嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* Ah) J-1 株两种培养基培养的去菌体上清中的胞外蛋白酶(ECP),同时用经典底物法进行了检测,两种方法所得结果相符。与底物法相比,脱脂奶溶蛋白琼脂扩散试验操作简便、敏感性高、重复性好。

关键词: 嗜水气单胞菌,胞外蛋白酶,检测

中图分类号: Q58.605 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)04-0286-03

ASSAY OF EXTRACELLULAR PROTEASES OF *AEROMONAS HYDROPHILA* BY SKIM MILK PROTEOLYSIS AGAR DIFFUSION TEST

ZHU Jie-Qing, JI Chuan-Yi, LU Cheng-Ping

(Animal Medicine college of Nanjing Agric Univ, Nanjing 210095)

Abstract: A new method skim milk proteolysis agar diffusion test (SMPAD) was established. Extracellular proteases in supernatants produced by *Aeromonas hydrophila* J-1 in different mediums were detected by SMPAD and the Azocasein substrat method. It was demonstrated that the two methods agreed with each other and the SMPAD test was charactered by more easily operated, more sensitive and better repeated.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, Extracellular proteases, Assay

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)能引致多种动物的败血症。在目前发现的众多的毒力因子中,胞外蛋白酶起关键性的作用,它可激活毒素前体并有利于细菌突破宿主的防线而在体内广为扩散,为细菌提供增殖所需的营养成分。因此,对 Ah 胞外蛋白酶(Extracellular proteases, ECP)的检测是其致病性的一个重要指征。

目前对 Ah 的 ECP 检测有底物(Azocasein)法、SDS-PAGE 酪蛋白原位消化与移位消化法以及 Dot-ELISA 法^[1]。除底物法外,其余各方法都只是对

* 国家九五攻关子课题

** 通讯作者

收稿日期:1999-03-11,修回日期:1999-06-25

ECP进行定性检测。本试验建立了定量检测ECP的脱脂奶溶蛋白琼脂扩散试验新方法(以下简称溶蛋白琼脂扩散试验),并与底物法进行了比较。

1 材料与方法

1.1 Ah ECP 产物的获取

AhJ-1株系陈怀青等从鲫鱼分离鉴定^[2],将该菌分别接种产毒素培养基^[3]与产酶培养基^[4],置28℃水浴摇床,200r/min培养48h。将上述培养物经5000r/min离心30min,0.22μm微孔滤膜过滤除菌得胞外产物。

1.2 ECP 的检测

1.2.1 溶蛋白琼脂扩散试验:配制含1%脱脂奶、1%琼脂的溶液,0.7×10⁵Pa高压蒸气灭菌,倾注灭菌平板,待琼脂凝固后打孔,孔径0.5cm。将两种培养基培养的去菌体上清(以下简称产毒上清与产酶上清)用灭菌缓冲液倍比稀释,加入上述脱脂奶琼脂板的孔中,每孔50μL,同时以热灭活的去菌体上清为阴性对照,以灭菌缓冲液为空白对照,平板置37℃湿盒24h,测量溶蛋白圈直径。以溶蛋白直径大于0.5cm(孔径)判为阳性。

1.2.2 底物法检测ECP:按照Allan和Stevenson的方法^[5]稍加改动。同1.2.1项将胞外产物上清倍比稀释,每一稀释度分别检测。将缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 1.15mL),酶样品(50μL),底物(10% Azocasein, Sigma, 50μL)加入试管混合,37℃作用1h,三氯乙酸(10%TCA 1.25mL)终止反应,室温放置30min,离心取上清,加入等体积1mol/L NaOH,用7520分光光度计测A₄₄₀,同时以热灭活的去菌体上清和缓冲液作为阴性和空白对照。

2 结果

用溶蛋白琼脂扩散试验检测AhJ-1株的产毒上清与产酶上清,能够检测的最高稀释倍数均为128,但前者的

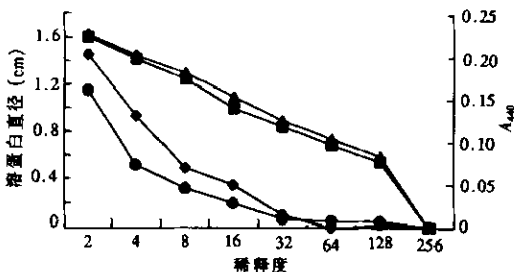


图1 溶蛋白琼脂扩散试验与底物法检测的ECP活力曲线

▲ 产毒上清溶蛋白直径, ■ 产酶上清溶蛋白直径,

◆ 产毒上清A₄₄₀, ● 产酶上清A₄₄₀

溶蛋白圈直径略大于后者(表1)。溶蛋白直径与酶浓度呈线性关系(图1)。

表1 溶蛋白琼脂扩散试验与底物法检测Ah ECP*

稀释度	产毒上清		产酶上清	
	溶蛋白直径(cm)	A ₄₄₀	溶蛋白直径(cm)	A ₄₄₀
2	1.62	0.202	1.60	0.160
4	1.45	0.130	1.42	0.073
8	1.30	0.069	1.25	0.045
16	1.10	0.049	1.00	0.028
32	0.90	0.015	0.85	0.010
64	0.75	0.000	0.70	0.008
128	0.60	0.003	0.55	0.007
256	0.00	0.001	0.00	0.001
NC	0.00	0.000	0.00	0.000
BC	0.00	0.000	0.00	0.000

*NC阴性对照,BC空白对照

底物法能够检测的最高稀释倍数为32(A₄₄₀ > 0.01),每一稀释度的A₄₄₀产毒上清也略大于相应稀释度的产酶上清(表1)。随着酶浓度的升高,两种上清的A₄₄₀也逐渐增大(图1)。

3 讨论

用脱脂奶平板划线培养检测Ah是否产生ECP是一个经典的方法^[5],但该方法只能定性检测ECP的产生,不能准确比较不同菌株的产酶能力。本试验将脱脂奶溶蛋白试验与琼脂扩散试验相结合,可以定量检测Ah培养上清中的ECP,是个创新。该法与底物法相比,其敏感性(能够检测的最高稀释倍数)高,而且也便于操作,结果判定直观可靠,无须特别设备。

底物法检测胞外蛋白酶,规定酶的活性单位为:在上述条件下,每小时水解Azocasein使A₄₄₀变化0.01为一个酶活单位^[5]。对于溶蛋白琼脂扩散试验,由图可见溶蛋白圈直径随酶浓度的增加而增加,呈线性关系,这符合米氏方程关于酶浓度对酶活性的影响规律,因此作者建议用能产生溶蛋白圈(直径 > 0.5cm)的酶最高稀释倍数,即溶蛋白价来表示酶活性(酶含量)的大小,也可以直接用溶蛋白圈直径的大小表示酶活性的大小。

脱脂奶溶蛋白琼脂扩散试验所用底物为酪蛋白,已知多种细菌的胞外蛋白酶均具有酪蛋白酶活性,此法不仅可用于嗜水气单胞菌,也可用于其它细菌所产蛋白酶的检测。用同一批脱脂奶配制的平板进行重复试验表明该试验重复性好,显示了良好的应用前景。

(下转 304 页)

(上接 287 页)

参 考 文 献

- [1] 李焕荣, 陈怀青, 陆承平等. 水生生物学报, 1997, 21(1): 97~100.
- [2] 陈怀青, 陆承平. 南京农业大学学报, 1991, 14(4): 87~91.

[3] 陈怀青, 陆承平, 赵肖等. 南京农业大学学报, 1993, 16(增刊): 85~87.

[4] 李焕荣, 陈怀青, 陆承平等. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 88~94.

[5] Allan B J, Stevenson R M W, Canadia, J. Microbiol, 1981, 27: 1114~1122.