

细菌酯酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳技术研究

潘 玲 李 纯

(安徽农业大学 合肥 230036)

摘要 本文应用纸片法筛选出 5 种动物病原菌的酯酶同工酶阳性株,并对 3 种强阳性株应用 PAGE 进行酶谱测定。同时对这些细菌酯酶同工酶样品的提取及测定条件进行了摸索。结果表明:不同细菌酯酶同工酶酶谱存在着显著差异。这为某些细菌种鉴定提供一种方法。

关键词 细菌,酯酶同工酶,聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

生物细菌产生酯酶同工酶,具有其种的特异性。不同微生物酯酶同工酶酶谱存在着一定的差异。因此可作为微生物分类、鉴定的依据之一^[1]。近年来,利用酯酶同工酶酶谱的不同对某些微生物如根瘤菌、食用真菌的金针菇、凤尾菇、昆虫病原白僵菌等进行鉴定、分类遗传育种方面的研究已有报道^[1~4]。但是,对于细菌,尤其是病原菌这方面的研究未见报道。我们于 1995 年 3 月~10 月间,对动物临床常见的病原菌进行酯酶同工酶的定位检测。并对其筛选的强阳性菌株,进行了酶谱分析。做了多次重复,现报告如下:

1 材料与方法

1.1 检测菌种

大肠杆菌 *Escherichia coli*、猪霍乱沙门氏菌 *Salmonella choleraesuis*、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、李氏杆菌 *Listeria monocytogenes*。前三种为本教研室保存的冻干菌种。后两种购置于四川农业大学动物医疗系的冻干菌种。选用酵母菌 *Y. Candida* 和 *Y. Brettanomyces* 为酯酶同工酶阳性对照菌株。

细菌选用改良胰酪琼脂或 LB 琼脂;酵母菌用 8°Be 麦汁琼脂培养基。

1.2 酯酶筛选试验

细菌菌种用肉汤或改良胰酪肉汤增菌过夜

后,涂布于 LB 琼脂平板,37℃ 培养 20h。取 whatman3 号滤纸剪成 1cm² 的小片,浸吸β-醋酸萘酯和α-醋酸萘酯等量混合的丙酮溶液(50μg / 每片),再将纸片贴于菌苔上,37℃ 下作用 10min 后,用小镊子取下滤纸片,置 0.1% (w / v) 的固牢兰 B 盐——磷酸缓冲液 (pH7.0) 中染色 2~3min,若滤纸片上出现紫色斑痕者,判为阳性;不出现紫斑痕者,为阴性。

1.3 酶样品提取

采用 TBE 冷浸法。即刮取φ9cm 平皿上生长茂盛的菌苔,置指形管中,加入 0.5ml 0.1MTBE (Tris-H₃BO₄-EDTA) 浸提液,旋涡混合器上混合均匀,置 -20℃ 下冷冻过夜,取出以 6000r / min 离心 5~7min,取上清液为酶样品。

对照样酵母菌的酶样品提取,采用研磨法。将刮取菌泥置预冷后的小研钵中,加入少许石英砂,冰浴研磨 10min,再加少量 0.1MTBE 提取液,置 -20℃ 下冷冻过夜,以 6000r / min 离心 5~7min,取上清即可。

1.4 PAGE 及染色

对酶样品采用双面垂直平板电泳槽,聚丙烯酰胺凝胶电泳,方法参见文献[5]。浓缩胶浓度为 3%,分离胶浓度为 7.5%,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸系统 (pH8.3),以溴酚兰为指示剂。待溴酚兰泳动到距凝胶下端 1cm 处,停止电泳。

电泳结束取下凝胶板,用 α -醋酸萘酯、 β -醋酸萘酯和固牢兰B盐染色,方法参见文献[6]。等显出清晰酶带后取出,用蒸馏水漂洗数次。用透明玻璃纸制成干板保存。为进一步验证实验结果,用岛津CS-930双光束双波长薄层层析扫描仪于550nm波长下对电泳图谱进行扫描。

2 结果与讨论

2.1 不同菌株酯酶定性试验

用纸片法对5种不同的细菌进行了酯酶定性检测,结果:*P. aeruginosa*、*A. hydrophila*、*L. monocytogenes*出现了深紫色斑痕,判为强阳性;而*E. coli*、*S. choleraesuis*仅出现了淡紫色斑痕,为弱阳性。试验表明,酯酶同工酶在这5种细菌中普遍存在,其含量因菌而异。

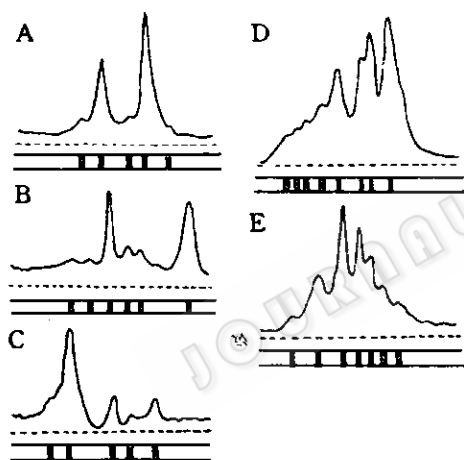


图1 不同菌株酯酶酶谱扫描图

A. *P. aeruginosa*; B. *L. Monocytogenes*;
C. *A. hydrophila*; D. *Y. candida*;
E. *Y. Brettanomyces*

2.2 细菌酯酶酶谱检测

对酯酶定性试验呈强阳性的3种细菌,用PAGE进行了酶谱测定,并与2种酵母菌进行比较。结果:细菌(原核细胞型微生物)的酯酶酶带较少,多为1~2条主带。不同细菌的酯酶酶带分布区域不同,差异显著。而酵母菌(真核细胞型微生物)的酶带较多。主带色泽深重而明显,不同种间亦存在着差异。见图1。这一结果较符合生物进化程度越高其生理生化系统也将

越趋于完善的理论。

2.3 PAGE检测条件的摸索

2.3.1 不同的酶提取方法比较:对参试样品分别以TBE冷浸法,TE浸透震拔法^[7]、丙酮法^[8]、蒸馏水反复冻融法和石英砂研磨法5种提取方法制备酶样品液。结果表明,细菌的酯酶同工酶的提取以TBE冷浸法效果最优,样品需用量也最小;而对真核细胞型的微生物酵母菌的酯酶同工酶的提取,则以石英砂研磨法最佳,但样品需用量大(详见另文报道)。

2.3.2 酶样品抽提时间对PAGE出带的影响:以TBE提取法对样品采用不同的抽提时间观察PAGE出带情况。具体做法是,对同一样品在加TBE液后,立即进行PAGE;以及在加TBE液后置-20℃冻存6h、24h、36h、48h、54h进行PAGE。结果:样品加TBE后立即进行PAGE和冻存6h者,均不出现酶带;而加TBE后冻存24h、36h者出带情况较好;48h、54h者随时间延长酶带减弱,某些酶带消失。结果表明:随着样品提取存放时间的延长,样品中酶活性下降。

2.3.3 不同加样量对PAGE出带的影响:进样量的多少取决于酶样品中酶含量,对用同一提取方法制备的同一批酶样品而言,加样量的不同势必影响出带情况。试验选用了25 μ l、50 μ l、75 μ l、100 μ l进行比较,结果:以50 μ l、75 μ l的加样量时,酶带较清晰;25 μ l时酶带较淡;100 μ l时有出现拖带的现象。

本文用PAGE对几种细菌酯酶同工酶进行了初步试探,证实了不同细菌酯酶同工酶酶谱存在着显著差异。这对某些细菌可以进行菌种纯度及种间差异方面的鉴定。对PAGE检测条件进行了摸索。试验表明,细菌的酯酶同工酶在酶样品提取及酶谱出带情况上,与真核细胞型微生物——酵母菌有很大的差异。笔者认为这可能与两类微生物的细胞壁结构以及生物进化程度不同有关。有些方面,如不同生长期细菌酯酶同工酶含量及酶带是否有变化?培养基中碳源、氮源及碳氮比对酶含量的影响等,尚有待进一步研究。

(下转第353页)

(上接第 380 页)

参 考 文 献

- [1] 丁彦怀,石勇民,马麟祥. 生物技术, 1993, 3(2): 15~17.
- [2] 李纯,汤坚,丁珊等. 安徽农学院学报, 1991, 18(3): 242~247.
- [3] 朱婉华,李兆兰,岑建农. 南京大学学报, 1987, 23(1): 186~190.
- [4] 陈都珍,成恒嵩,宓晓黎. 真菌学报, 1987, 6(1): 34~41.
- [5] 李建武,肖能懋,余瑞元等编. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994, 189~190; 342.
- [6] 胡能书编著. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985, 75~76.
- [7] 程光胜,李玲阁,张启先译. 微生物实验法. 北京: 科学出版社, 1981, 206.
- [8] 赵友福,张克雍,葛起新. 微生物学通报, 1993, 20(2): 117~119.