

猪胸膜肺炎放线杆菌尿素酶的提取及特性研究

王 妮,刁有祥,刘方娜,孟凡磊,王 辉

(山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018)

【摘 要】 【目的】从猪血清 7 型胸膜肺炎放线杆菌中提取纯化尿素酶,并对其生物特性和理化特性进行研究。【方法】超声破碎放线杆菌粗提尿素酶,再采用硫酸铵盐析和 Sephadex G-200 凝胶过滤层析对该酶进行纯化,分析其活性及理化特性。【结果】最适于猪胸膜肺炎放线杆菌尿素酶保持活性的 pH 为 8.5,温度为 45 ℃。在该条件下其比酶活约为 96.253 U/mg;SDS-PAGE 电泳显示,胸膜肺炎放线杆菌尿毒酶含分子质量为 11,25 和 60 ku 的亚单位。【结论】与传统方法相比,超声破壁和 Sephadex G-200 凝胶过滤层析纯化法简单快速,重复性好,测定尿素酶的特性稳定,能满足实验室检测的要求。

【关键词】 猪传染性胸膜肺炎;胸膜肺炎放线杆菌;尿素酶;超声破壁;酶活性;理化特性

【中图分类号】 S858.286.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)02-0034-05

Purification and characterization of urease from *Actinobacillus pleuropneumoniae*

WANG Ni, DIAO You-xiang, LIU Fang-na, MENG Fan-lei, WANG Hui

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: 【Objective】 Urease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 was purified to study its physical and biochemical properties. 【Method】 Urease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 was extracted, then $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation and Sephadex G-200 gel filtration were used to extract and purify urease. 【Result】 The optimum pH and temperature for the urease to keep the activities were 8.5 and 45 ℃. The specific activity of urease under this situation was 96.253 U/mg. The urease had three subunits, and the molecular weight for each was about 11, 25 and 60 ku by SDS-PAGE. 【Conclusion】 Using ultrasonication and Sephadex G-200 gel filtration to extract urease was a simple and quick measure, the results of which were stable and could reach the requirement of experiment properties.

Key words: Porcine contagious pleuropneumonia; *Actinobacillus pleuropneumoniae*; urease; ultrasonication; activity of urease; physical and biochemical properties

猪传染性胸膜肺炎(Porcine contagious pleuropneumonia)是由胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)引起的一种以肺脏出血、坏死以及胸膜纤维素性粘连为特征的呼吸道传染病^[1]。该病发病急、死亡快,对养猪业危害严重。加

强对胸膜肺炎放线杆菌的研究,对控制猪传染性胸膜肺炎,保护和促进养猪业的发展具有重要意义。

APP 是一种革兰氏阴性的小杆菌,根据培养过程中其对 NAD 的依赖性,可分为生物 I 型和生物 II 型两种。生物 I 型有 12 个血清型,其中血清 5 型

* [收稿日期] 2006-12-26

[基金项目] 山东农业大学科技创新基金项目(23414)

[作者简介] 王 妮(1981—),女,山东龙口人,在读硕士,主要从事畜禽病原的分离鉴定与防治研究。

E-mail: wangni0416@163.com

[通讯作者] 刁有祥(1962—),男,山东胶州人,教授,主要从事畜禽病原的分离鉴定与防治研究。E-mail: yxdiao@163.com

又分为5a和5b两个亚型;生物Ⅱ型有2个血清型。生物Ⅰ型有致病性,而生物Ⅱ型的致病力较弱^[2]。APP引起猪致病的毒力因子有溶血毒素、荚膜多糖、脂多糖、外膜蛋白、转铁结合蛋白、蛋白酶、尿素酶以及渗透因子等^[3-5]。其中尿素酶对APP的存活及宿主的致病起着重要作用,它能水解尿素产生 NH_3 和 CO_2 ,既能促使APP大量繁殖,又会对机体胃粘膜屏障和十二指肠及泌尿系统造成损害^[6],是一种重要的毒力因子。研究APP尿素酶生物学特性和理化特性,对探讨APP的致病机理具有重要意义^[7]。Janine等^[6]于1997年对血清1型APP尿素酶的结构及生物学特性和理化特性进行了研究,结果表明,该酶包括结构基因*UreA*、*UreB*、*UreC*和辅助基因*UreE*、*UreF*、*UreG*、*UreD*,含有分子质量为60,11.3和11 ku的亚单位。但截至目前,国内尚未见相关报道,本研究以从山东省分离的血清7型APP为试验菌株,经液体培养后,分离提纯了尿素酶,并对尿素酶的生物学特性和理化特性进行了研究,以期为该病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 仪器与试剂 超声波细胞粉碎机(JY92-Ⅱ,宁波新芝科器研究所);紫外分光光度计(UV-2012C,尤尼柯(上海)仪器有限公司);电泳仪(Bio-rad,意大利);聚乙二醇6000(天津环华化学试剂厂);丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺(北京鼎国生物技术发展中心);Sephadex G-200(北京欣经科生物技术公司)。

1.1.2 菌 株 血清7型APP,由本实验室从山东省分离鉴定并保存。

1.2 APP 尿素酶的提取

参考文献[8]的方法稍加改进。挑取固体培养基培养后的单菌落接种到2 000 mL液体培养基中,37℃培养24 h。离心收集放线杆菌,用60 mL pH8.0的0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液悬浮,在冰水浴中超声波破碎(超声条件:功率400 W,工作时间20 s,间隔时间10 s,全程15 min),于8 000 r/min冷冻离心20 min后收集上清即为粗酶,测定酶活性及蛋白含量。

1.3 APP 尿素酶的纯化

1.3.1 硫酸铵盐析 取10 mL粗酶,慢慢加入硫酸铵至20%饱和度,4℃静置24 h,10 000 r/min离心30 min,分别收集上清和沉淀。在收集的上清液

中再加入硫酸铵,按照同样的方法依次调节硫酸铵饱和度到30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%。收集每一个饱和度的沉淀蛋白,用5 mL的0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液溶解,分别测定各组分的酶活性,以确定最适硫酸铵饱和度。

1.3.2 尿素酶的透析与浓缩 将剩余50 mL粗酶缓慢加入硫酸铵至最适饱和度,4℃过夜后于10 000 r/min离心30 min,收集沉淀用0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液溶解,加入透析袋中,于去离子水中4℃透析24 h,其间充分换水并搅动。透析后的酶液用PEG-6000浓缩至原体积的1/10时取出。

1.3.3 Sephadex G-200 凝胶过滤层析 采用Sephadex G-200纯化样品,上样前用大约2倍柱体积的样品缓冲液平衡层析柱,将浓缩后的样品上样,洗脱时间大约为1倍柱体积时间,流速为0.4 mL/min。层析结束后收集酶活洗脱峰。

1.3.4 尿素酶浓度的测定 采用280 nm光吸收法测定^[9]。

1.3.5 尿素酶纯度的鉴定 用丙烯酰胺配制体积分数为12%的分离胶和体积分数为5%的积层胶,取粗酶和各步纯化的尿素酶20 μL上样进行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色。

1.4 APP 尿素酶活性的检测

1.4.1 标准曲线的制作 采用奈氏定氮法制作标准曲线^[10],具体操作方法如下:准备16个25 mL的容量瓶,分别加入标准 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液(0.322 mg/mL)1.4,1.2,1.0,0.8,0.6,0.4,0.2和0 mL,每个体积做2个平行样,分别“定容至25 mL→加入1 mL奈氏试剂→显色20 min→480 nm处测定吸光度”,以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的量(μmol)为横坐标,吸光度为纵坐标作图即得标准曲线。

1.4.2 尿素酶活性的测定 参考文献[10]方法稍加改进。取含0.33 mol/L尿素和pH8.0的0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液1.9 mL,加0.1 mL提取的酶液,置45℃水浴中恒温10 min,再加入0.1 mL三氯醋酸终止反应,继续作用15 min,10 000 r/min离心5 min后取0.5 mL上清,加入7.0 mL蒸馏水和1.0 mL奈氏试剂,室温静置10 min后在480 nm处测定其吸光度,用硫酸铵标准曲线计算酶比活(U/mg)。

1.5 APP 尿素酶理化特性测定

1.5.1 pH对APP尿素酶活性的影响 取9支试管,分别加入1.9 mL pH为6.0,6.5,7.0,7.5,7.7,8.0,8.5,9.0和9.5的Tris-HCl缓冲液(含0.33 mol/L尿素),再往各试管加入0.1 mL酶液,根据

尿素酶活性测定方法,测定不同 pH 值下尿素酶的 OD_{480 nm}。

1.5.2 温度对 APP 尿素酶活性的影响 取 7 支试管分别加入 pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液(含 0.33 mol/L 尿素)和 0.1 mL 尿素酶液,分别在 25,30,35,40,45,50 和 55 ℃下反应,测定不同温度下尿素酶的 OD_{480 nm}。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵盐析结果

将粗提尿素酶经硫酸铵分级盐析后,对不同饱和度硫酸铵盐析所得蛋白酶活性检测结果见图 1。

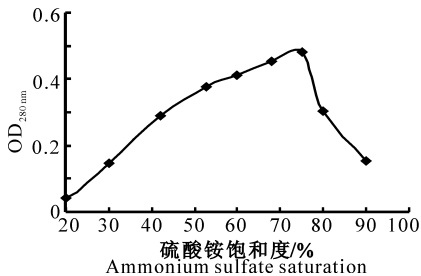


图 1 不同硫酸铵饱和度中尿素酶酶活曲线
Fig.1 Activity of urease distribution in ammonium sulfate fractional precipitation

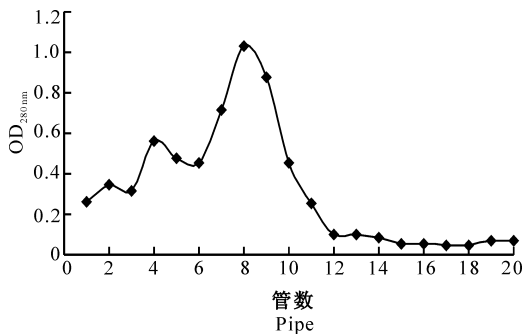


图 2 Sephadex G-200 凝胶过滤层析洗脱曲线
Fig.2 Purification of APP urease with Sephadex G-200 gel filtration

从图 1 可以看出,粗酶中的目的蛋白可以被硫酸铵沉淀出来,随着硫酸铵饱和度的增加,目的蛋白的沉淀量逐步增大。当硫酸铵饱和度达到 75%时,目的蛋白的沉淀量达到最大,此后若继续增加硫酸铵饱和度,目的蛋白的析出量逐渐减少。由此可见,目的蛋白的析出主要集中在 50%~75%的硫酸铵饱和度范围内,说明最适的盐析硫酸铵饱和度为 75%。

2.2 Sephadex G-200 凝胶过滤层析结果

由图 2 可以看出,粗提尿素酶经 Sephadex G-200 凝胶过滤层析后,共洗脱出 3 个峰。检测收集到的各部分洗脱液的酶活性,其结果见图 3。由图 3 可见,图 2 中的第 3 个洗脱峰 3(6~10 管)具有很强的尿素酶活性,而其他峰则不显示活性,由此可以推断出放线杆菌尿素酶存在于峰 3 中。由洗脱峰峰形可以看出,目的蛋白含量较高,且分离较完全,SDS-PAGE 纯度检测也证实了这一点。

2.3 APP 尿素酶酶活性及蛋白含量

由 APP 尿素酶纯化结果(表 1)可以看出,经凝胶过滤层析纯化后,尿素酶的回收率为 40.9%,纯化倍数为 6.7 倍。在 APP 尿素酶纯化过程中,凝胶过滤层析中酶的损失较大,但能提高尿素酶的纯度。

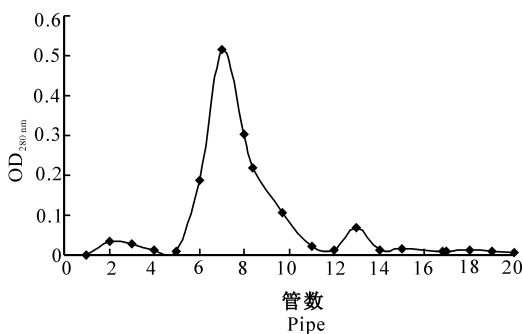


图 3 Sephadex G-200 凝胶过滤层析尿素酶酶活曲线
Fig.3 Activity of APP urease with Sephadex G-200 gel filtration

表 1 胸膜肺炎放线杆菌尿素酶纯化结果

Table 1 Purification of APP urease

纯化步骤 Purification step	蛋白浓度/(mg · mL ⁻¹) Protein density	蛋白量/mg Total protein	总酶活/U Total activity	酶比活/(U · mg ⁻¹) Specific activity	纯化倍数 Purification fold	回收率/% Recovery
超声破碎上清 Cell extraction	3.394	101.82	1 461.42	14.353	1.0	100.0
硫酸铵盐析 (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	1.752	26.28	1 244.04	47.338	3.3	85.1
凝胶过滤层析 Sephadex G-200	0.621	6.21	597.73	96.253	6.7	40.9

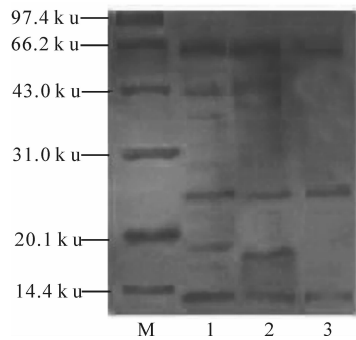


图 4 APP 尿素酶的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 蛋白质分子量标准;1. 放线杆菌超声上清;
2. 硫酸铵盐析后的粗酶;3. 凝胶过滤后的酶活性峰样品

Fig. 4 Analysis of purified *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease by SDS-PAGE

M. Protein Marker;1. Sonicated supernatant;2. APP urease salting-out by ammonium sulfate;3. Purified APP urease by Sephadex G-200 gel filtration

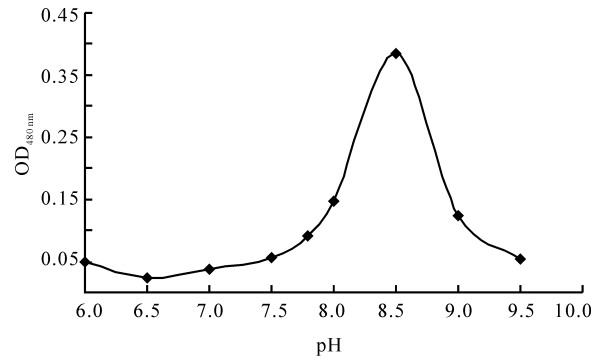


图 5 pH 值对 APP 尿素酶活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on APP urease activity

3 讨 论

1)本研究采用超声破壁法从胸膜肺炎放线杆菌中粗提尿素酶,避免了搅拌、高速分散等方法粗提时酶活的损失,但由于超声处理产生热量很高,容易引起蛋白质变性,因此破碎过程在冰水浴中进行,有效的避免了其对尿素酶活性的影响。

2)目前,关于提纯尿素酶的方法已有很多报道^[11],如使用一次性凝胶过滤即可得到一定纯度的尿素酶^[12]。若欲得到高纯度尿素酶,则必须使用3~4步层析技术^[13-14],但采用该技术会使提纯工艺流程增多,并可能导致酶的损失。本研究参照范凯等^[8]提取幽门螺杆菌尿素酶的方法,改进后将其用于制备 APP 尿素酶。本试验结果表明,该方法操作简单、快速,对试剂、仪器设备要求低,能满足实验室研究的需要。但由于该方法提取的尿素酶浓度较

2.4 APP 尿素酶纯度鉴定结果

由 SDS-PAGE 电泳检测结果(图 4)可知,粗提的放线杆菌尿素酶经硫酸铵盐析和 Sephadex G-200 凝胶过滤层析提纯后,样品显示出 3 条带,其分子质量分别为 11,25 和 60 ku,这表明样品已经被提纯,杂蛋白基本上被去除。

2.5 APP 尿素酶理化特性测定结果

2.5.1 pH 对 APP 尿素酶活性的影响 从 pH 值对 APP 尿素酶活性影响的测定结果(图 5)可以看出,APP 尿素酶的最适 pH 为 8.5。

2.5.2 温度对 APP 尿素酶活性的影响 由温度对 APP 尿素酶活性影响的测定结果(图 6)可以看出,从 25 ℃ 开始尿素酶活性持续上升,至 45 ℃ 达到最大值,此后随温度升高酶活性下降,表明尿素酶的最适反应温度为 45 ℃。

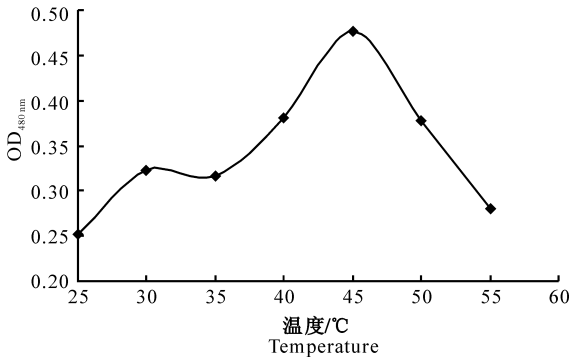


图 6 温度对 APP 尿素酶活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on APP urease activity

低,不适用于大量生产,如何改进制备方法以适用于生产的需要,还有待于进一步研究。

3)由 SDS-PAGE 电泳结果可以看出,粗酶显示多条杂带,而经 Sephadex G-200 凝胶过滤层析后的尿素酶仅显示出 3 个亚单位,其分子质量分别为 11, 25 和 60 ku,与 Janine 等^[6]的结果(11,11.3,60 ku)有所不同,这可能是由于血清型的差异引起的,也可能是其他因素所致,具体原因尚需进一步研究验证。本研究还对提取的 APP 尿素酶酶学特性进行了研究,表明该酶在 pH 为 8.5,温度为 45 ℃ 时活性最高。本研究只是针对血清 7 型胸膜肺炎放线杆菌尿素酶进行的研究,不同血清型放线杆菌产生的尿素酶,其生物学特性和理化特性方面是否一致也有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Tonnipitak W,Baltes N,Hennining P I,et al. Construction of an

Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 2 prolype live negative maker vaccine[J]. *Infect and Immun*, 2002, 70(12): 7120-7125.

[2] Jacobsen M J, Nielsen J P, Nielsen J R. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model[J]. *Vet Microbiol*, 1996, 49, 3-4.

[3] Ward C K, Lawrence M L, Veit H P, et al. Cloning and mutagenesis of a serotype specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5; Concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharidesin recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1[J]. *Infect and Immun*, 1998, 66: 3326-3336.

[4] Choi C, Kwon D, Min K, et al. Detection and localization of apx I - II and-III genes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in natural porcine *Pleuropneumoniae* by in situ hybriddization[J]. *Vetrinary Microbiology*, 2001, 38: 390-395.

[5] Baltes N, Tonpitak W, Gerlach G F, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: Effects on bacterial virulence and host immune response[J]. *Infect and Immun*, 2001, 69(1): 472-478.

[6] Janine T, Janet I. Genetic and biochemical analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease[J]. *Infect Immun*, 1997, 65(11): 4389-4394.

[7] Bosse J T, MacInnes J I. Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection[J]. *Can J Vet Res*, 2000, 64(3): 145-150.

[8] 范 凯, 陈学奎, 秦 敏, 等. 幽门螺杆菌尿素酶的纯化和鉴定[J]. *中国生物制品学杂志*, 1999, 12(4): 210-212.

Fan K, Chen X K, Qin M, et al. The purification and characterization of *Hellicobacter pylori* [J]. *China Journal of Biologics*, 1999, 12(4): 210-212. (in Chinese)

[9] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 38-39.

Wang J Z, Fan M. The hindbook of protein methods[M]. Beijing: Science Press, 2000: 38-39. (in Chinese)

[10] 施特尔马赫 B. 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊, 译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.

Stellmach B. Determination method of enzyme[M]. Qian J Y Trans. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1992. (in Chinese)

[11] 张建中, 陈晶晶, 杨昭徐, 等. 幽门螺杆菌尿素酶抗原的分离和纯化[J]. *中华微生物学与免疫学杂志*, 1995, 15(2): 344-346.

Zhang J Z, Chen J J, Yang Z X, et al. The seperation and purification of *Hellicobacter polori* antigen[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 1995, 15(2): 344-346. (in Chinese)

[12] Austin J W, Doig P, Stewart M, et al. Macromolecular structure and aggregation states of *Helicobacter pylori* urease[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(18): 5663-5667.

[13] Bruce E D, Campbell G P, Guillermo I, et al. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori* [J]. *The J of Biological Chemistry*, 1990, 265: 9464-9465.

[14] Pierre M, Ireue C I, Davin C, et al. Immunization of BALB/C mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* urease[J]. *Gastroenterology*, 1994, 107: 1002-1011.