

小球藻病毒 PBCV-1 特异性溶壁酶(Lysin)的溶壁活性*

韩继刚^{1,2} 刘平芳² 康明^{1,2} 叶寅^{2**} 田波²

(¹ 河北大学生命科学学院 保定 071002)(² 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要: 从 PBCV-1 感染小球藻 NC64A 的细胞裂解液中提取了 Lysin 的粗制剂, 酶活底物范围分析表明, 几丁质酶、壳聚糖酶和 β -1,3-葡萄糖苷酶是 Lysin 活性的主要组成部分, 并与小球藻细胞壁的组成成分相吻合。其中几丁酯酶和壳聚糖酶, 特别是几丁酯酶在裂解小球藻细胞壁的过程中发挥了重要的作用。Lysin 粗制剂经 FPLC 分离纯化得到分子量分别为 52kD、56kD 的两个几丁质酶(Chi1 和 Chi2) 和一个分子量为 36kD 的壳聚糖酶。

关键词: 小球藻病毒, Lysin, 几丁质酶, 壳聚糖酶, β -1,3-葡萄糖苷酶

中图分类号: S432.4⁺ 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)03-0354-05

1963 年 Safferman 和 Morris 首先发现了裂解蓝藻的“LPP”型原核藻类病毒^[1], 七十年代初 Lee^[2]报道了真核藻类病毒粒子的存在。进一步的研究发现原核藻类病毒同真核藻类病毒无论是形态、结构, 还是生化性质、感染情况都是截然不同的。现在已在 14 个已知的真核藻纲中的 10 个纲发现有病毒或病毒类粒子(Viruslike particles, VLPs), 其中对小球藻病毒和褐藻病毒的研究最为详细^[3]。由于真核藻类病毒的研究具有重要的理论意义和在藻类基因工程上潜在的巨大应用价值而越来越受到人们的重视。小球藻病毒是一类基因组巨大的真核藻类病毒, 模式株为 PBCV-1, 直径为 150~190nm, 呈多角体, 基因组为线状 dsDNA, 330kb, 带有共价闭合的发夹环末端结构。对 PBCV-1 的深入研究为了解病毒及病毒-宿主之间相互作用的分子生物学提供了全新的材料, 也使 PBCV-1 感染的小球藻系统成为一个研究光合真核生物基因表达与调控的理想模型^[4~10]。

PBCV-1 的侵染周期类似于噬菌体, 采用在细胞壁上“打孔”的方式将自身 DNA 导入宿主细胞, 在完成 DNA 转录、复制及子代病毒装配后, 通过裂解宿主细胞壁的方式释放子代病毒。病毒在早期侵入及晚期子代病毒释放过程中, 都需要特异性降解小球藻细胞壁的溶壁酶(Lysin)的存在^[10], 然而对该类酶的来源及本质都不清楚。本文以 Lysin 为研究对象, 探讨各种消解细胞壁的酶类在病毒侵染周期中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 小球藻及小球藻病毒: 小球藻 NC64A 株系及小球藻病毒 PBCV-1 由 Van Etten 和夏远南博士(University of Nebraska, Lincoln)惠赠。

* 国家自然科学基金(39870016)和河北省科技厅攻关计划资助

** 联系人

作者简介: 韩继刚(1970-)男, 河北省满城县人, 河北大学生命科学学院讲师, 主要从事植物分子生物学研究。

收稿日期: 2001-07-30, 修回日期: 2001-11-29

1.1.2 培养基 :MBBM 培养基是在 BBM 培养液中加入 0.5% 蔗糖及 0.1% Pepton^[6-7], 常规方法灭菌后备用。

1.1.3 试剂 :壳聚糖、蓝色几丁质、海带多糖及 Glycol chitosan 等试剂均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 小球藻 NC64A 株系的培养 :NC64A 小球藻细胞于 MBBM 中, 25℃ 光照摇瓶(120r/min) 培养至细胞浓度为 $1 \sim 2 \times 10^7$ 个/mL, 备用。

1.2.2 PBCV-1 病毒的纯化 :参照张远征等的方法^[11-12]。

1.2.3 小球藻病毒 PBCV-1 的滴定(噬斑测定) :参照张远征等的方法^[11-12]。

1.2.4 Lysin 的粗提 :小球藻 NC64A 细胞离心后重悬沉淀, 以 0.01 的感染复数接种 PBCV-1 培养过夜, 离心弃沉淀, 取上清 10 000r/min, 5℃ 离心 60min。上清于 4℃ 顺序加入 2-巯基乙醇至 2mmol/L, EDTA 至 5mmol/L, NaN₃ 至 200mg/L, 硫酸铵至 40% 饱和度, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 4℃ 过夜后同样条件离心, 上清于 4℃ 时加入硫酸铵至 65% 饱和度, 调 pH 至 7.0, 4℃ 过夜。10 000r/min, 4℃ 离心 10min, 将沉淀溶于含有 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 2mmol/L 2-巯基乙醇及 2mg NaN₃, pH8.0 的溶液中; 10 000r/min, 4℃ 离心 60min。上清于 4℃ 透析, 透析液 10 000r/min, 4℃ 离心 60min, 弃沉淀, 上清存于 -20℃。

1.2.5 Lysin 活力的测定 (1) :对 NC64A 细胞壁的降解活性, 将 1mL NC64A 细胞培养物离心, 用灭菌 BBM 洗涤两次, 溶于 300 μ L 灭菌的 BBM 中, 加入 150~200 μ g Lysin, 于 22℃ 保温 60min 后, 加入 2mL 5% SDS 溶液, 室温放置 30min 后, 测 OD₈₀₀。形成原生质球形体的比例按以下公式计算: % Spheroplasting = 100 - [(OD2/OD1) × 100]; 其中, OD1 为对照组, OD2 为实验组。(2) 壳聚糖酶、 β -1, 3-葡萄糖苷酶、纤维素酶及果胶酶活力的测定: 采用 Somogyi 试剂比色法^[13]。(3) 几丁质酶活力的测定: 参照 Hackman 及 Goldberg 的方法^[14]。

1.2.6 Lysin 粗制剂的 FPLC(LKB) 纯化 :以 SP Sepharose Fast Flow 为阳离子交换填料; SOURCE 30Q 为阴离子交换填料。按照 Pharmacia Fine Chemicals 有关说明操作, 收集洗脱峰并对收集样品进行透析。

1.2.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 :参照 Laemmli 等的方法^[15]。

2 结果和讨论

2.1 Lysin 粗制剂的提取

目前国内外尚未见到有关病毒编码的特异性 Lysin 研究的详细报道^[11, 17]。根据 Lysin 在病毒侵染周期中的作用, 推测其为多个蛋白的混合物。因此采用了硫酸铵分级沉淀的方法, 从 PBCV-1 感染小球藻 NC64A 的细胞裂解液中提取 Lysin 的粗制剂。实验表明, Lysin 对 NC64A 的细胞壁具有消解作用(图 1)。

2.2 Lysin-NC64A 细胞壁消解指示系统的建立

经过 Lysin 去壁处理后的小球藻细胞可以部分或全部变为原生质球形体, 因此原生质球形体的生成率可以间接指示 Lysin 酶活力的大小。

2.2.1 溶液系统 :为避免在实验过程中因系统渗透压的改变而导致小球藻细胞原生质球形体发生溶胀破裂产生假阳性, 因此选用灭菌的 BBM 作为溶液系统。

2.2.2 Lysin 与小球藻细胞浓度对检测体系的影响 :实验发现小球藻细胞浓度与 Lysin 量

的比值与原生质球形体生成率成负相关,当这一比值达到 1×10^8 个细胞/ $200 \mu\text{g}$ Lysin 时,原生质球形体生成率可以达到 99% 以上。此时检测体系的灵敏度最高(图 2)。

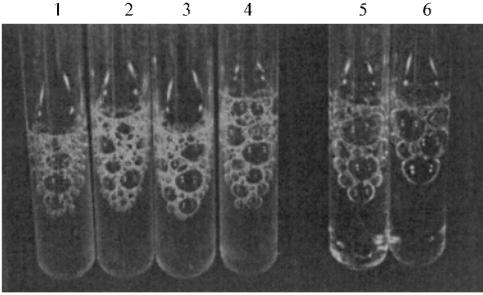


图 1 Lysin 对小球藻 NC-64A 细胞的溶壁作用

Fig.1 The cell wall degradation of chlorella strain NC64A by Lysin anenzym(s) encoded by PBCV-1 genome 1 through 4 :Cells treated by Lysin(the clean , green color liquid shows the cell walls digested and cells broken);5 and 6 : Control(no lysin added).

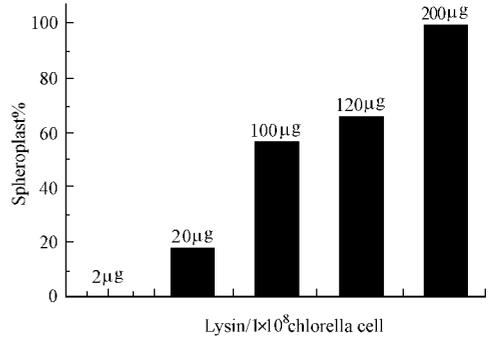


图 2 Lysin/小球藻细胞浓度对酶活检测体系灵敏度的影响

Fig.2 Effect of the ratio of lysin(μg) to chlorella cell concentration(per 10^8 cells) to the sensitivity of lysin activity survey system

2.2.3 SDS 降解小球藻细胞原生质球形体 将 Lysin 与 NC64A 细胞于 22°C 保温后,加入离子去垢剂 SDS(5%) (参照 Invitrogen 公司的原生质球形体构建系统),反应体系由浑浊液变为清澈透明的绿色溶液(图 1)。因此 Lysin 对小球藻细胞壁具有降解活性。推测该降解现象的原理是:Lysin 作用后的小球藻细胞壁上出现了许多小孔,加入离子去垢剂后,细胞膜解体导致细胞内含物外泄使反应体系呈现清澈透明的绿色溶液。分别测定实验组、缓冲液对照组和 BBM 对照组的 OD_{800} ,发现经 Lysin 完全作用后的小球藻细胞形成原生质球形体的比例超过 99%,这样就建立起了一个操作简单且灵敏度高的 Lysin-NC64A 细胞壁消解指示系统的模型。该体系的建立为进一步研究 Lysin 的作用奠定了基础。

2.3 Lysin 酶活的底物范围

小球藻 NC64A 细胞壁组成中,葡萄糖和鼠李糖分别占总糖量的 51% 和 16%,而半乳糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖及葡萄糖胺分别占总糖量的 5% ~ 10%;而且所有病毒敏感型

表 1 PBCV-1 特异性的 Lysin 酶活分析

Table 1 Enzyme activity analysis of Lysin encoded by PBCV-1 genome

Substrates	Lysin	Lysin(deactivated by boiling)
Blue Chitin	++	-
Chitin	+++	-
Kelp polysaccharide	+	-
Sodium nitrocellulose	-	-
Pectin	-	-

Note : + "Activity ;" - "No activity.

小球藻细胞株系的细胞壁中都含有葡萄糖胺成分,占细胞壁总糖量的 7% ~ 17%^[16-17]。病毒能够穿透小球藻细胞壁,说明可能存在一些相应的酶类能够降解 β -1, 3-葡萄糖苷的多聚物和 β -1, 4-D-葡萄糖胺的多聚物,如壳聚糖、几丁质等。表 1 的数据表明,几丁

质酶(底物蓝色几丁质)、壳聚糖酶(底物壳聚糖)和 β -1, 3-葡萄糖苷酶(底物海带多糖)是 Lysin 活性的主要组成部分。这与小球藻细胞壁的组成是相吻合的。同时进一步说明小球藻虽然属真核藻类,但在细胞壁组成上仍同高等植物存在着差异。

2.4 Lysin 的 FPLC 纯化

通过硫酸铵沉淀所获得的 Lysin 制剂是一种多蛋白成分的粗提物。为了进一步阐明 Lysin 的作用机制及各组分蛋白的功能,有必要对其进行进一步的分离纯化。分别以 20mmol/L PBS(pH6.0, 0.1mol/L NaCl, 0.25mol/L NaCl, 0.5mol/L NaCl)和 50mmol/L 醋酸钠(pH5.0, 0.05mol/L NaCl, 0.33mol/L NaCl, 1.0mol/L NaCl)为缓冲液分步洗脱, SDS-PAGE 结果见图 3 和图 4。对原液、穿透峰及各洗脱峰进行的酶活底物范围鉴定(SDS-PAGE 法原位酶活测定)表明: 20mmol/L PBS 0.25mol/L NaCl 洗脱峰中两条 52 kD 和 56 kD 的蛋白具几丁质酶活性, 为几丁质酶, 并命名为 Chi1(52kD), Chi2(56 kD); 50mmol/L 醋酸钠 0.33mol/L NaCl 洗脱峰中一条 36kD 的蛋白具壳聚糖酶活性, 为壳聚糖酶。

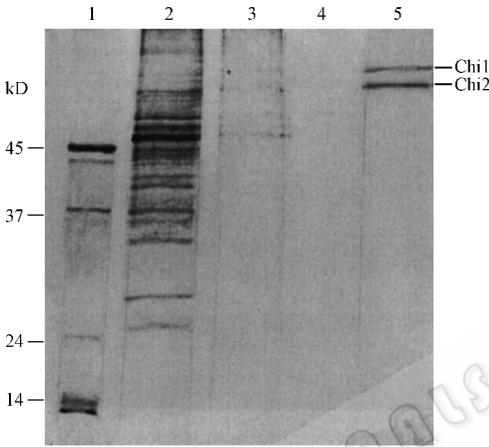


图 3 Lysin PBS 各洗脱峰的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE pattern of Lysin fractions eluted by PBS washing buffer

1: Protein molecular weight marker; 2: Crude protein extract; 3: Slow through fraction; 4: 0.1mol/L NaCl fraction; 5: 0.25mol/L NaCl fraction.

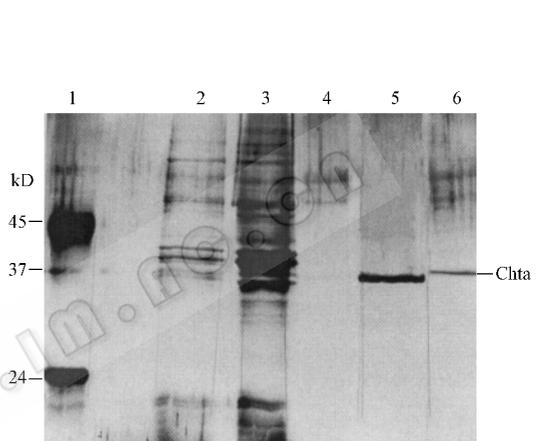


图 4 Lysin 醋酸钠溶液洗脱峰的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE pattern of Lysin fractions eluted by sodium acetate buffer

1: Protein molecular weight marker; 2: Slow through fraction; 3: Crude extract; 4: 0.05mol/L NaCl fraction; 5: 0.33mol/L NaCl fraction; 6: 1.0mol/L NaCl fraction.

小球藻细胞溶壁实验表明: 经 Chi1 及 Chi2 处理的小球藻细胞并不裂解, 但可导致小球藻细胞由翠绿色变为黄褐色, 引起细胞死亡。具壳聚糖酶活性的 36kD 蛋白处理的小球藻细胞没有此现象。实验还发现: 经过穿透峰处理的小球藻细胞出现与 Chi1、Chi2 处理后相同的结果, 其它洗脱峰均不出现此反应。因此可以认为在 Lysin 裂解小球藻细胞壁的过程中, 几丁质酶和壳聚糖酶, 特别是几丁酯酶发挥了重要的作用, 但细胞壁的裂解还需要其它成分的协同作用。

3 结 论

采用硫酸铵分级沉淀的方法, 从 PBCV-1 感染的小球藻 NC64A 细胞裂解液中提取的 Lysin 粗制剂, 对 NC64A 细胞壁具有消解作用。本实验中建立的 Lysin-NC64A 细胞壁消解指示系统, 具有操作简单、灵敏度较高的特点, 实现了 Lysin 酶活的即时检测。酶活底物范围分析表明, 几丁质酶、壳聚糖酶和 β -D-葡聚糖苷酶是 Lysin 活性的主要组成部分, 并与

小球藻细胞壁的组成成分相吻合。Lysin 经 FPLC 分离纯化得到分子量分别为 52kD、56kD 的两个几丁质酶 Chi1 和 Chi2 和一个分子量为 36kD 的壳聚糖酶,溶壁试验证明,在 Lysin 裂解小球藻细胞壁的过程中,几丁酯酶和壳聚糖酶,特别是几丁酯酶发挥了重要作用。然而其确切的作用机制及同 Lysin 中其它酶活性的相互关系还有待于对其进行进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Safferman R S, Morris M E. *Science* ,1963 ,**140** :679 ~ 680.
- [2] Lee R E. *J Cell Sci* ,1971 ,**8** :623 ~ 631.
- [3] 赵以军,石正丽.中国病毒学 ,1996 ,**11**(2) :93 ~ 102.
- [4] Van Etten J L, Meints R H, Burbank D E, *et al.* *Virology* ,1981 ,**113** :704 ~ 711.
- [5] Van Etten J L, Meints R H, Kuczmariski D, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1982 ,**79** :3867 ~ 3871.
- [6] Van Etten J L, Burbank D E, Xia Y, *et al.* *Virology* ,1983 ,**126** :117 ~ 125.
- [7] Van Etten J L, Burbank D E, Kuczmariski D, *et al.* *Science* ,1983 ,**219** :994 ~ 996.
- [8] Van Etten J L, Burbank D E, Schuster A M, *et al.* *Virology* ,1985 ,**140** :135 ~ 143.
- [9] Van Etten J L, Burbank D E, Meints R H. *Intervirology* ,1986 ,**26** :115 ~ 120.
- [10] Van Etten J L, Lane L C, Meints R H. *Microbiological Review* ,1991 ,**55**(4) :586 ~ 620.
- [11] 张远征,王苏燕,叶寅,田波.微生物学报 ,1996 ,**36**(1) :67 ~ 68.
- [12] 张远征,王苏燕,叶寅,田波.微生物学报 ,1996 ,**36**(3) :176 ~ 180.
- [13] Somogyi M. *J Bio Chem* ,1952 ,**195** :19 ~ 23.
- [14] Hackman R H, Goldbery M. *Anal Biochem* ,1964 ,**8** :397.
- [15] Laemmli U. *Nature* ,1970 ,**227** :680 ~ 685.
- [16] Meints R H, Burbank D E, Van Etten J L, *et al.* *Virology* ,1988 ,**164** :15 ~ 21.
- [17] Yamada T, Hiramatsu S, Songsri P, *et al.* *Virology* ,1997 ,**230** :361 ~ 368.

The Cell Wall-degrading Activities of Lysin Encoded by Chlorella Virus PBCV-1*

Han Jigang^{1,2} Liu Pingfang² Kang Ming^{1,2} Yie Yin² Tian Po²

(¹ College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

(² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract : Lysin was isolated from Chlorella NC64A lysate which was infected by Chlorella virus PBCV-1. The enzyme property detection of lysin shows that it contains at least three enzyme activities : chitinase, chitosanase and β -1,3-Glucanase. This is consistent with the compose of Chlorella cell wall. Chitinase and chitosanase, especially chitinase plays a important role in the process of virus entry. One 52kD chitinase, one 56kD chitinase and one 36kD chitosanase were obtained after purified by FPLC.

Key words : Chlorella virus, Lysin, Chitinase, Chitosanase, β -1,3-Glucanase

* Project Granded by Chinese National Natural Science Fund(39870016)