

灰色链霉菌 RX-17 溶菌酶 R1 的纯化及性质研究

赵 昕 任光文 屠晓平 张玉臻*

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 通过硫酸铵分级沉淀、CM-Sephadex C-50、CM-Sepharose Fast Flow 离子交换层析及 Sephadex G-75 凝胶过滤层析,从灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)RX-17 的发酵上清液中得到了电泳纯的溶菌酶 R1,回收率 6.89%。测得该酶分子量和等电点分别为 16.8kD 和 9.10,作用于变链球菌(*Streptococcus mutans*)Ingbritt 的最适温度和 pH 分别为 70℃和 6.6。R1 酶在 50℃以下及 pH6~9 的范围内保持稳定,60℃保温 1h,残存酶活 20.3%。 Mg^{2+} 对酶有激活作用,而 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 则使酶完全丧失活性。螯合剂、盐酸羟胺、碘乙酸抑制酶活, β -巯基乙醇及表面活性剂则对溶菌酶有部分促进作用。R1 酶溶菌谱广泛,对多种卵清溶菌酶不能作用的 G^+ 、 G^- 细菌均有溶解能力,对变链球菌、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)等则呈现高活性。

关键词 灰色链霉菌,溶菌酶,纯化与性质,变链球菌

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)06-0758-06

溶菌酶(Bacteriolytic enzyme),又称细胞壁水解酶,专门作用于细菌细胞壁的骨架物质——肽聚糖。按照对肽聚糖作用位点的差异,溶菌酶可分为作用于聚糖链的胞壁质酶(Muramidase)、作用于肽桥的内肽酶(Endopeptidase)以及作用于连接聚糖链与肽桥间酰胺键的 *N*-乙酰-*L*-丙氨酸酰胺酶^[1](*N*-acetylmuramoyl-*L*-alanine amidase)。由于具有直接杀菌作用,溶菌酶常被用作杀菌剂。作为一种蛋白质,它与化学杀菌剂、抑制剂相比,安全性能高,且只作用于细菌细胞壁,不分解其他营养物质^[2]。目前常用的卵清溶菌酶(Hen egg-white lysozyme)已作为一种工具酶广泛应用于生产、科研,但很多 G^+ 细菌如金黄色葡萄球菌、变链球菌及多数 G^- 细菌对卵清溶菌酶呈非敏感性,极大限制了它的进一步应用^[1]。本文从灰色链霉菌 RX-17 中分离得到的溶菌酶 R1,属胞壁质酶,能够作用于多种卵清溶菌酶不能分解的 G^+ 、 G^- 细菌,溶菌谱广泛,且对牙菌斑主要构成菌群——变链球菌、乳杆菌及医院中主要致感染菌——金黄色葡萄球菌具有高溶解活性,在龋病的预防及病原感染菌的控制等方面有独特的前景。本文报道了该酶的纯化过程及部分理化性质。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

层析设备、等电聚焦电泳系统为 Pharmacia 公司产品,一般电泳系统为 Bio-Rad 公司产品。CM-Sephadex C-50、CM-Sepharose Fast Flow、Sephadex G-75 等层析介质均为 Pharmacia 原

* 通讯作者。Tel 86-531-8362259;E-mail: yzzhang@sdu.edu.cn

作者简介 赵 昕(1978-),女,山东泰安市人,硕士研究生,主要从事微生物溶菌酶的生化与分子生物学研究。

E-mail: gwren@sina.com.cn

收稿日期 2003-01-06,修回日期:2003-07-15

装。牛血清白蛋白、低分子量蛋白 Marker(分子量范围 14.4 ~ 94.7kD)、两性电解质载体 (pH3.5 ~ 10) 为国产分析纯。

1.2 菌种和培养

灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) RX-17、变链球菌 (*Streptococcus mutans*) 均为本室保存菌株,其中变链球菌 Ingbritt 为国际标准菌株,文中除“R1 酶的溶菌谱”部分外,其他部分采用的底物均为此菌株培养物。其他指示菌由山东大学生命科学院菌种室保存。有关 RX-17 溶菌酶粗制品及各种指示菌悬液的制备参见文献 [3]。

1.3 溶菌活力测定

R1 酶活力测定^[3] 将 1mL 适当稀释的 R1 酶及适量指示菌悬液加入 5mL 5mmol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH5.6) 中,使上述混合体系的 OD_{580} 在 0.7 ~ 0.8 之间,55℃ 保温 10min,测定 10min 前后的 OD_{580} 变化。每分钟使反应液浊度降低 0.001 个 OD_{580} 单位的酶量定义为一个酶活单位,酶活 (U/mL) = $(OD_{0min} - OD_{10min}) \times 1000 \times \text{稀释倍数} / 10$,这样得到的结果减去经煮沸灭活处理后酶液的酶活即为真实酶活的数值。

卵清溶菌酶活力测定根据 Shugar 等^[4]的方法稍加改进:取 1mL 适当稀释的卵清溶菌酶 (Sigma) 及适量指示菌悬液加入 5mL 0.1mol/L PBS (pH6.5) 中,使混合体系 OD_{450} 为 0.7 左右,30℃ 保温 10min,测定 10min 前后的 OD_{450} 变化。活性单位定义与计算同 R1 酶。

1.4 蛋白含量测定

按 Lowry 等^[5]的方法测定,以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

1.5 电泳分析

酶的纯度及分子量测定采用 SDS-PAGE 方法进行,分离胶浓度 12%,浓缩胶浓度 5%。等电点测定采用等电聚焦电泳 (IEF)。

2 结果和分析

2.1 溶菌酶 R1 的分离纯化

2.1.1 硫酸铵分级沉淀与透析脱盐 采用硫酸铵 25 ~ 70% 饱和度分级沉淀 RX-17 溶菌酶粗制品,沉淀用少量 5mmol/L PBS (pH7.5) 溶解,置截流量 10000 的透析袋中 4℃ 条件下对 5mmol/L PBS (pH7.5) 充分透析。

2.1.2 CM-Sephadex C-50 离子交换层析 上一步透析液加样 CM-Sephadex C-50 柱 (2.6cm × 25cm),以 5mmol/L PBS (pH7.5) 洗约 5 个柱床体积,采用 0 ~ 0.6mol/L NaCl 线性梯度洗脱,流速控制 18mL/h。目的蛋白——溶菌酶 R1 在 NaCl 浓度约 0.15mol/L 处得到洗脱。

2.1.3 CM-Sepharose Fast Flow 离子交换层析 R1 蛋白峰收集,4℃ 条件下对 5mmol/L PBS (pH7.2) 充分透析后,上已被相同缓冲液充分平衡的 CM-Sepharose Fast Flow 柱 (1.0cm × 10cm),采用 0 ~ 0.2mol/L NaCl 线性梯度洗脱,流速控制 24mL/h, R1 酶在 NaCl 浓度约 0.12mol/L 处得到洗脱。

2.1.4 Sephadex G-75 凝胶过滤层析 将上步所得 R1 酶样品置透析袋中以 PEG20000 浓缩约 20 倍,4℃ 条件下对 5mmol/L PBS (pH7.5) 充分透析后,加样到已被相同缓冲液充分平衡的 Sephadex G-75 柱 (1.6cm × 100cm) 上,以 5mmol/L PBS (pH7.5) 洗脱,流速控制 9mL/h,收

集有活性的部分。

经过上述步骤 样品 SDS-PAGE 显示单一条带(图 1) 纯化过程中蛋白含量及 R1 酶对 *S. mutans* Ingbritt 的活力变化见表 1。

表 1 灰色链霉菌 RX-17 溶菌酶 R1 的纯化

Table 1 Purification of bacteriolytic enzyme R1 from *S. griseus* RX-17

Step	Total protein/mg	Total activity/ × 10 ³ U	Specific activity(U/mg)	Activity recovery /%	Purification fold
Crude extract	4250	350	82.4	100	1
Ammonium sulfate	704	221	314	63.1	3.81
CM-Sephadex C-50	9.45	46.5	4921	13.3	59.7
CM-Sepharose FF	3.82	36.2	9476	10.3	115
Sephadex G-75	2.37	24.1	10169	6.89	123

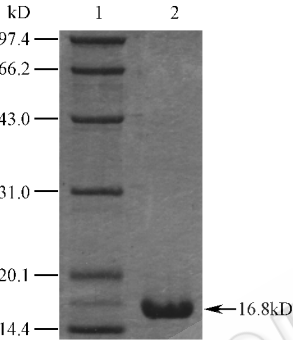


图 1 溶菌酶 R1 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of bacteriolytic enzyme R1
1. Marker ;
2. Bacteriolytic enzyme R1.

2.2 酶的性质

2.2.1 分子量和等电点 采用 SDS-PAGE 法测定酶的分子量约为 16.8kD(图 1) IEF 法测定酶的等电点约为 9.10。与大部分溶菌酶类似 R1 酶也是一种低分子量的碱性蛋白质。

2.2.2 最适反应温度及热稳定性 在 0℃ ~ 100℃ 之间测定 R1 酶在 5mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH5.6)中对 *S. mutans* Ing- britt 的最适作用温度及酶的热稳定性。结果表明 ,R1 酶作用于 *S. mutans* Ingbritt 的最适温度为 70℃。在对热稳定性上 , 50℃ 保温 1h ,R1 酶残余酶活 86.5% ,60℃ 保温 1h ,R1 酶仅剩约 20.3% 的活力。与卵清溶菌酶相比 ,R1 酶的热稳定性稍差。

2.2.3 最适作用 pH 及 pH 稳定性 :反应体系为 5mmol/L 的广泛范围 pH 缓冲液及甘氨酸-盐酸、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 ,作用温度为 70℃。R1 酶溶解 *S. mutans* Ingbritt 的最适 pH 为 6.6 在 pH6 ~ 9 范围内 R1 酶保持稳定(4℃ ,24h)。过酸、过碱的环境不利于酶的活性保持 ,尤其是在酸性环境中 ,酶活性损

失很大 ,在 pH3 的条件下 残余酶活仅为 20% 左右。但在甘氨酸-盐酸、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中 ,pH2.4 ~ 3.6 及 pH8.6 ~ 10.4 的条件下 4℃ 存放 24h ,R1 酶并未见活力的损失。

2.2.4 金属离子和化合物对酶活力的影响 :调整反应体系中各金属离子、化合物终浓度为 1mmol/L 4℃ 保持 1h ,测定 R1 酶对 *S. mutans* Ingbritt 的溶解情况(表 2)。

在金属离子中 , Mg^{2+} 对 R1 酶有激活作用 , Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 基本不影响酶活力 ,其他离子对 R1 酶活力都有不同程度的抑制 ;从螯合剂 EDTA、8-羟基喹啉、焦磷酸钠对酶活性的普遍抑制来看 ,金属离子对酶活力的发挥是必须的 ;羰基抑制剂——盐酸羟胺 ,巯基抑制剂——碘乙酸均能使酶丧失大部分活性 ,而 β -巯基乙醇则有较强的激活作用 ,可初步推断酶的活性中心含有羰基、巯基 ;各种离子及非离子型表面活性剂通过去除细菌细胞壁外的非聚糖成分 ,均不同程度的促进了溶菌作用。

表 2 各种离子、化合物对酶活力的影响

Table 2 Effect of some metal ions and compounds on R1

Metal ions/(1mmol/L)	Relative activity of enzyme R1/%	Compounds/(1mmol/L)	Relative activity of enzyme R1/%
MgCl ₂	150	EDTA	61.9
CaCl ₂	98.8	8-Hydroxyquinoline	91.0
ZnCl ₂	0	Sodium pyrophosphate	33.8
CuCl ₂	0	Hydroxylamine hydrochloriae	38.9
MnCl ₂	82.9	Monoiodoacetic acid	32.0
CoCl ₂	40.8	2-Mercaptoethanol	148
BaCl ₂	97.3	SDS	118
FeSO ₄	0	Triton X-100(0.1%)	138
CdSO ₄	0	Tween-80(0.1%)	106
AgNO ₃	31.8	Sodium deoxycholate	114
Pl(CH ₃ COO) ₂	0	Control	100

2.2.5 R1 酶的溶菌谱 :收集各种 G⁺、G⁻ 细菌及酵母菌对数生长期细胞作为底物 ,测定 R1 酶对它们的溶解活性 ,并把对溶壁微球菌 AS1.267 的活性定为 100 ,与鸡卵清溶菌酶对相同底物的活性进行了比较 (表 3)。

表 3 R1 酶的溶菌谱

Table 3 Bacteriolytic spectrum of enzyme R1 on some bacteria and yeasts

Microorganisms		Relative activity/%	
		Bacteriolytic enzyme R1	Hen egg-white lysozyme
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	AS1.267	100	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	AS1.282	475	0
<i>Sarcina lutea</i>	AS1.193	7.09	16
<i>Streptococcus cremoris</i>	AS1.9	250	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	AS1.101	79.5	6
<i>Bacillus subtilis</i>	AS1.338	0	6
	AS1.88	261	28
<i>Bacillus sphaericus</i>	AS1.930	124	35
<i>Bacillus pumilus</i>	AS1.940	156	12
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	AS1.1482	481	4
<i>Lactobacillus brevis</i>	AS1.12	561	0
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	AS1.925	490	0
<i>Escherichia coli</i>	AS1.1128	86.6	0
	AS1.77	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AS1.1129	117	0
<i>Alcaligenes faecalis</i>	AS1.924	41.7	0
<i>Streptococcus mutans</i>	Ingbritt	486	0
	MT8148	653	0
	BHT	651	0
	HS-1	632	0
<i>Streptococcus sobrinus</i>	OMZ176	643	0
	OMZ175	639	0
<i>Streptococcus downei</i>	Mfe28	422	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AS2.295	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	AS2.1001	0	0

与卵清溶菌酶相比,R1酶具有较广的溶菌谱,对于变链球菌、金黄色葡萄球菌、产氨短杆菌及两株乳杆菌表现出较强的溶解能力,对于G⁻大肠杆菌AS1.1128、铜绿假单胞菌AS1.1129,R1酶也有部分作用。延长作用时间至2h,大部分菌株可以全部溶解。大肠杆菌AS1.77、枯草芽孢杆菌AS1.338及两株酵母菌对R1酶表现非敏感性。

3 讨论

对微生物溶菌酶的研究是从寻找比卵清溶菌酶溶菌谱更为广泛溶菌酶的过程中开展起来的。目前,已发现多种有实用价值的微生物溶菌酶,研究较为透彻的有拟内串生孢霉所产的Ch酶^[6],来源于球孢链霉菌1829的M1酶^[7]及来源于天蓝色链霉菌的Cellosyl^[8]等。这些溶菌酶溶菌谱普遍比卵清溶菌酶广泛,很多已商品化生产,并在食品防腐、龋病及炭疽病的防治等方面有应用性报道^[7-9]。但国内对微生物溶菌酶的研究与国外相比相对落后,目前仅有少数几种微生物有产溶菌酶的报道,如球孢链霉菌S186^[10,11]和灰色链霉菌RX-17^[3]等。本文从灰色链霉菌RX-17发酵液中成功纯化得到了溶菌酶R1,并对其性质作了初步的了解。

溶菌酶R1是一种低分子量的碱性蛋白质,溶菌谱较卵清溶菌酶及已报道的Ch酶、M1酶、Cellosyl等广泛,对变链球菌、乳杆菌及金黄色葡萄球菌溶解能力强,对G⁻细菌如大肠杆菌、铜绿假单胞菌也有作用。该酶的作用有菌株特异性,这体现在它对两株大肠杆菌及两株枯草芽孢杆菌的活性差异上,表明R1酶对细菌细胞壁的细微结构高度敏感。在pH2.4~3.6及pH8.6~10.4的甘氨酸-盐酸、甘氨酸-氢氧化钠缓冲体系中4℃放置24h,R1酶活性保持不变,而在相同pH的其他缓冲液中,酶活力下降50%~80%,说明在含有甘氨酸的酸性、碱性环境中,酶的活力易于保持,出现这种现象的原因正在进一步探讨之中。激活剂和抑制剂的试验表明,该酶活性发挥需要金属离子的参与,酶的活性中心可能含有巯基和羰基。而作为牙膏的主要添加成分——表面活性剂对酶有促进作用,可以考虑将该酶作为牙膏添加剂,用于龋病的防治。在热稳定性能等方面,R1酶逊色于卵清溶菌酶。作为一种天然蛋白,R1酶纯化的得率较低,这是限制其应用的障碍之一。通过基因工程的手段,获得R1酶高表达工程菌株,并从分子水平上改造酶基因,提高蛋白的热稳定性能是今后本文研究的重点内容。

参 考 文 献

- [1] Li S, Norioka S, Sakiyama F. Purification, characterization, and primary structure of a novel cell wall hydrolytic amidase, CwhA, from *Achromobacter lyticus*. *J Biochem*, 2000, **127**: 1033~1039.
- [2] 船津胜, 鹤大典. 溶菌酶. 李兴福, 译. 济南: 山东科学技术出版社, 1982. 256.
- [3] 任光文, 赵 昕, 刘红蕾, 等. 链霉菌RX-17溶菌酶的研究. 生物技术, 2002, **12**(3): 20~22.
- [4] Shugar D. Determination of lysozyme. *Biochem Biophys Acta*, 1952, **8**: 302.
- [5] 李建武, 肖能庆, 余瑞元. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994. 168~170.
- [6] Lyne J E, Carter D C, He X M, et al. Preliminary crystallographic examination of a novel fungal lysozyme from *Chalaropsis*. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 6928~6930.
- [7] Lichenstein H S, Hastings A E, Langley K E, et al. Cloning and nucleotide sequence of the N-acetylmuramidase M1-encoding gene from *Streptomyces globisporus*. *Gene*, 1990, **88**: 81~86.
- [8] Astrid R, Tanis H, Rudiger M, et al. A new lysozyme fold: crystal structure of the muramidase from *Streptomyces coelicolor* at 1.65 Å resolution. *J Biol Chem*, 2001, **276**(34): 31994~31999.

- [9] Schuch R , Nelson D , Fischetti V A . A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis* . *Nature* , 2002 , **418** (6900) : 884 ~ 889 .
- [10] 刘同军 , 徐文琳 , 孙文波 , 等 . 溶氧对变溶菌素发酵的影响 . *生物工程学报* , 2000 , **16** (2) : 229 ~ 231 .
- [11] 刘同军 , 徐文琳 , 张玉臻 . 变溶菌素(Mutanolysin) 研究历史和发展前景 . *微生物学报* , 2000 , **40** (2) : 224 ~ 227 .

Purification and Some Properties of Bacteriolytic Enzyme R1 from *Streptomyces griseus* RX-17

Zhao Xin Ren Guangwen Tu Xiaoping Zhang Yuzhen *

(State Key Laboratory of Microbial Technology , Shandong University , Jinan 250100 , China)

Abstract : Bacteriolytic enzyme R1 was purified to electrophoretic homogeneity with the recovery of 6.89% activity by ammonium sulfate precipitation , CM-Sephadex C - 50 , CM-Sephadex Fast Flow and Sephadex G-75 chromatography from the culture supernatant of *Streptomyces griseus* RX-17 . The molecular weight and PI of R1 were 16.8kD and 9.10 . The optimal temperature and pH for R1 against *Streptococcus mutans* Ingbritt were 70°C and 6.6 , respectively . Below 50°C and at range pH 6 ~ 10 , R1 was stable . While treated at 60°C for 1 hour , the residual activity was only about 20.3% . Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} could completely inactivate the enzyme . Chelating agents , hydroxylamine hydrochloride , Monoiodoacetic acid inhibited the lytic activity against *Streptococcus mutans* Ingbritt , whereas Mg^{2+} , 2-Mercaptoethanol and some surfactants could stimulate the activity . The enzyme had a broad bacteriolytic spectrum against many G^+ , G^- bacteria which were resistant to egg-white lysozyme . Especially high activity was shown on *Streptococcus mutans* , *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus* .

Key words : *Streptomyces griseus* , Bacteriolytic enzyme , Purification and properties , *Streptococcus mutans*

* Corresponding author . Tel 86-531-8362259 ; E-mail : yzhang@sdu.edu.cn

Received date : 01-06-2003

《微生物学报》2004 年征稿计划

为了适应我国生物科技飞速发展的需要 , 促进国内外学术交流 , 本刊 2004 年征稿的主要内容如下 :

1. 国家高技术研究发展计划项目(即国家“863 计划”)和国家基础研究发展规划项目(即国家“973 项目”)
2. 国家自然科学基金资助的重点基金项目、青年基金资助项目、杰出青年基金项目、地区基金项目和面上资助项目以及省部级基金资助项目。
3. 国家科技攻关项目及省部级科技攻关项目。
4. 国际合作项目。
5. 具创新性或有重大突破的基础和应用基础研究成果 , 对我国西部大开发具有重要学术价值和应用价值的研究成果。

对于高水平的论文本刊将优先发表。欢迎投稿 ! 欢迎订阅 ! 欢迎提出宝贵意见 !