

U₂₃ 细菌溶解酶性质的研究

江慧修 李悦 徐浩

(中国科学院微生物研究所, 北京)

我们对 U₂₃ 细菌溶解酶^[1]溶解细菌细胞壁的产物进行了测定和分析, 结果证明这是一种属于糖苷酶类型的细菌溶解酶。该酶不溶解几丁质。分子量 27,000, 等电点 pH11.3。酶的结晶具有类似于蛋清溶菌酶结晶的多形性质, 因结晶条件不同, 获得三种不同形状的酶结晶。

我们在前文^[1]报道了由一株侧孢芽孢杆菌 *Bacillus laterosporus* AS 1.864-U₂₃ 产生 U₂₃ 细菌溶解酶的最适条件、酶的提纯, 溶菌条件及溶菌谱等。根据对细菌细胞壁作用部位的不同, 可将细菌溶解酶分为多种类型^[2]。这些不同类型的细菌溶解酶是研究细菌细胞壁肽聚糖结构的有力工具。本文报道 U₂₃ 酶溶壁过程中壁与作用产物的消长关系, 证明 U₂₃ 酶是一种属于糖苷酶类型的细菌溶解酶。我们用控制酶溶液的盐浓度和 pH 的方法获得了三种不同形状的酶结晶。此外还报道了 U₂₃ 酶的分子量, 等电点及其对几丁质的作用等性质。

材料与方 法

(一) 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* AS

1.397 细胞壁的准备

经牛肉汁液体培养基摇瓶培养 16 小时的菌液于 5000 转/分离心 10 分钟收集菌体, 蒸馏水洗涤三次。菌悬液于冰浴条件下用超声波振荡器(频率为 19 千赫)处理 10 分钟, 然后低速离心(4000 转/分)以除去未被破碎的细胞。破碎部分经 12,000 转/分离心 20 分钟收集, 再于 37℃ 水浴用牛胰核糖核酸酶液(0.5mg/ml 溶于 pH7.5 的 0.1M 磷酸盐缓冲液中)处理 1 小时, 枯草杆菌蛋白酶液(2500u/ml 于 pH7.0 的 0.1M 磷酸盐缓冲液中)处理 3 小时, 以除去破碎后残附在壁上

的原生质, 12,000 转/分离心 20 分钟收集沉淀部分, 用蒸馏水洗涤三次, 即得到细胞壁制品。如需保存, 可经冷冻干燥制成干粉。图 1A、B 为超声波处理 10 分钟后得到的细胞壁电镜照片。大部分呈口袋形, 保留了原菌体的轮廓。若超声波处理的时间过长, 则大部分细胞壁都成了碎片(图 1-C)。用上述方法获得的细胞壁制品在被 U₂₃ 酶消化过程中吸光度(A_{400nm})逐步下降, 在作用的前期取样制片, 电镜观察可看到细胞壁被破坏的情况, 图 2 是酶作用 10 分钟后的残留壁。

(二) U₂₃ 细菌溶解酶

为经硫酸铵盐析, DEAE-纤维素柱提纯的电泳纯样品。

(三) 酶解作用

细胞壁的酶解作用均在 pH7.5 的 0.05M 磷酸盐缓冲液中, 于 45℃ 进行。酶解程度以反应液吸光度(A_{400nm})的下降程度来表示。

(四) 还原能力的测定

使用 Park 和 Johnson 的方法^[3], 取 4.5ml 酶解反应液与 0.1ml 铁氰化钾、碳酸钠和氰化钾的混合液于沸水浴中作用 15 分钟, 冷却后加 0.25ml 硫酸铁铵溶液显色, 测定反应液的吸光度(A_{400nm}), 查还原糖含量与吸光度关系的标准曲线计算含量。

(五) N-乙酰氨基己糖的测定

用经 Guhysen^[4]改进的 Reissing 等人的方

本文于 1981 年 9 月 2 日收到。

本文的电镜摄影及其它摄影工作均由本所技术室协助完成。郝凤兮、何忠效同志协助进行等电聚焦实验, 在此一并致谢。

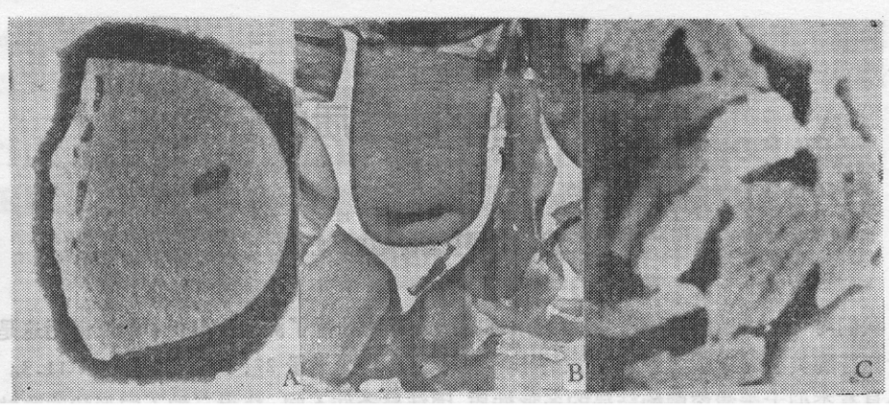


图1 *B. subtilis* AS 1.397 的细胞壁

Fig. 1 Cell wall of *B. subtilis* AS 1.397

A: 超声波处理 10 分钟, 1% 磷钨酸钠负染。

Disrupted by ultrasonic oscillation 10 min, negatively stained with 1% PTA ($\times 36,000$).

B: 超声波处理 10 分钟, 2% 磷钨酸钠染色。

Disrupted by ultrasonic oscillation, 10 min, negatively stained with 2% PTA ($\times 12,000$).

C: 超声波处理 20 分钟, 1% 磷钨酸钠负染。

Disrupted by ultrasonic oscillation, 20 min, negatively stained with 1% PTA ($\times 48,000$).

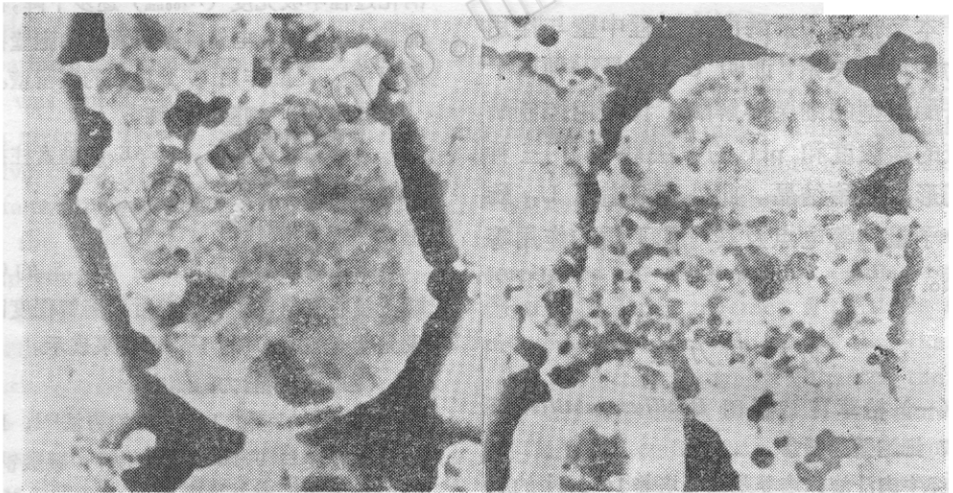


图2 经 U_{23} 细菌溶解酶作用 10 分钟的 *B. subtilis* AS 1.397 残留细胞壁

Fig. 2 Residual Cell wall of *B. subtilis* AS 1.397 lysed by U_{23} bacteriolytic enzyme for 10 min

1% 磷钨酸钠负染 Negatively stained with 1% PTA ($\times 36,000$)

法。即 0.2ml 酶解反应液与等体积的 2% $Na_2B_4O_7$ 溶液混合, 于沸水浴中作用 30 分钟, 冷却后加新配制的 Morgan-Elson 试剂于 37°C 反应 20 分钟, 测波长在 585nm 的吸光度, 根据用乙酰氨基葡萄糖为样品作的标准曲线, 计算含量。

(六) 游离氨基的测定

用二硝基氟苯试剂法^[2]。0.2ml 酶解反应液, 加 0.2ml 2% $Na_2B_4O_7$ 与 0.04ml 二硝基氟苯试剂于 60°C 水浴作用 30 分钟, 然后加 1.6ml 2N HCl 酸化, 测定在 420nm 的吸光度, 查标准曲线计算含量(用丙氨酸作标准曲线)。

(七) 酶等电点测定

用密度梯度聚焦法^[4]。使用 LKB 厂生产的聚焦仪和载体两性电解质 (pI9—11)。

(八) 酶分子量测定

用 SDS-聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳^[5]。

结果与讨论

(一) U_{23} 细菌溶解酶溶壁过程中壁与产物的消长关系

肽聚糖是维持细菌细胞壁构型的骨架, 切断构成此网格的多糖链、肽链, 均会导致细菌细胞壁的瓦解。不同类型的溶解酶所解开的部位不同, 可以通过测定和分析溶壁过程中壁与某些产物的消长关系来了解酶所作用的部位。 U_{23} 酶具有相当广的溶菌谱^[1], 据此可以推测它所作用的部位很可能是在细菌细胞壁所共有的多糖链上^[6]。为确证此点, 我们作了如下试验: 称取 100mg 细胞壁的冷冻干燥粉与 20ml 活力为 3000u/ml 的 U_{23} 酶液混合, 于 45℃ 水浴保温, 定时取此反应液测定 A_{600nm} , 以此值表示残存壁的浓度。取反应液经 12,000 转/分离心 20 分钟的上清液部分, 测定还原能力和游离氨基。以壁样品经 2N HCl 于 100℃ 水解 2 小时所测得的还原能力为 100%, 来计算由于酶解所形成的还原能力占总量的百分比。同样, 以经过 6N HCl 110℃ 水解 10 小时的样品所测得的游离氨基量为 100%, 来计算经酶解所释放的游离氨基占壁肽聚糖总肽链中氨基酸的百分比, 结果见图 3。

随着壁悬液的 A_{600nm} 值由 1.42 下降到 0.21, 还原能力由 0 上升到 28.8%, 而整个过程没有游离氨基释放; 并且具有还原基团的物质和具有乙酰氨基己糖反应的物质两者释放的量相应地增长。(图 4)。上述结果说明此酶作用的部位不是肽聚糖网格中的肽链, 而是解开了网格中多糖链

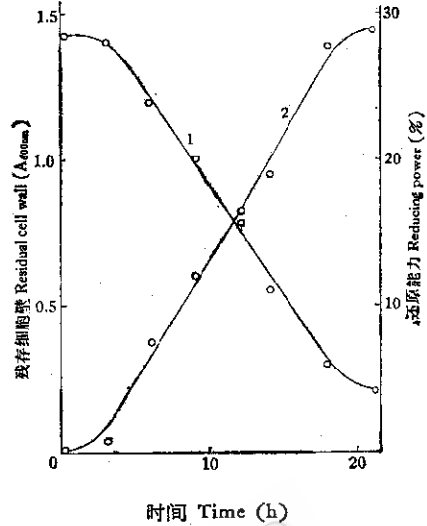


图 3 细胞壁溶解与还原能力产生的关系
Fig. 3 Relation between cell wall lysis and reducing power

1. 残存壁 Residual cell wall (A_{600nm})
2. 还原能力 Reducing power (%)

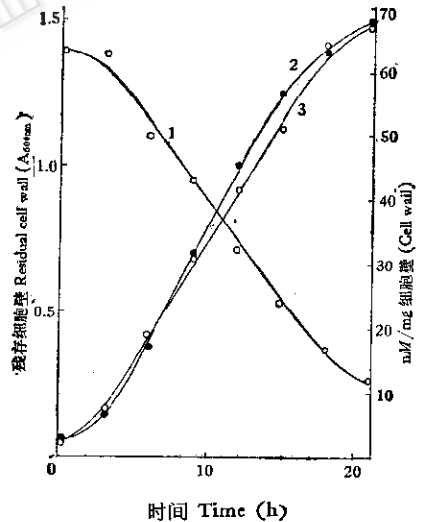


图 4 溶壁过程中产物的分析
Fig. 4 Products analysis during cell wall lysing process

1. 残存细胞壁 Residual cell wall (A_{600nm})
2. 具乙酰氨基己糖反应的物质 (nM/mg 细胞壁) Acetylhexosamine-reactive material (nM/mg cell wall)
3. 具还原基团的物质 (nM/mg 细胞壁) Material with reducing group (nM/mg cell wall)

上的部分糖苷键。

(二) U_{23} 细菌溶解酶对几丁质无溶解作用

称 20mg 几丁质与 2ml 活力为 7000u/ml 的 U_{23} 酶或上海禽蛋厂出产的鸡蛋清溶菌酶 (Lysozyme) 的酶液混合。分别用各自最适的反应条件作用 24 小时,取上清液部分测定具还原基团物质的含量,结果如表 1。

表 1 酶对几丁质的作用

Table 1 Action of enzymes on chitin

酶 Enzyme	具还原基团的物质 (nM/mg 几丁质) Material with reducing group (nM/mg chitin)		
	1	2	3
Lysozyme	11.75	10.12	11.93
U_{23}	0.27	0.18	0.32

因已知 Lysozyme 对几丁质有微弱的溶解作用,用其作对照同时进行测定。从结果可得知, U_{23} 酶对几丁质无溶解作用。这一点与以 *Chalatroopsis* sp. 产的 Lysozyme Ch. 为代表的一类酶对底物的要求很相似^[7]。即作用底物中乙酰氨基己糖环 C_3 上的乳糖肽链是不可缺少的,否则便不能溶解,而 Lysozym1 对此要求则不严格。

(三) 酶的结晶

1. U_{23} 细菌溶解酶结晶的获得

U_{23} 酶的结晶是在酶溶液中加入一定浓度的氯化钠,并把溶液的 pH 控制在等电点或近于等电点的条件下形成的。称取一定量的酶制品溶于蒸馏水中,加固体氯化钠达 2%,再用 1N 氢氧化钠调至

pH8.5—11.5,于 4°C 放置数小时便开始有结晶形成,约四天结晶量达到最高值。在上述 pH 范围内,结晶的形成量随 pH 的升高而增加(见表 2)。形成结晶的最低蛋白浓度是 1mg/ml,低于此浓度得不到结晶。溶液中氯化钠浓度要适当,超过 5% 则产生大量不定形沉淀,而得结晶极少。酶结晶的形状随结晶时的 pH 而异,在 pH8.5—9.5 是散针形(图 5-1),在 pH 10.5—12.5 为排列成麦捆状的针形结晶(图 5-2),其它条件不变,pH 低于 8.5 则不产生结晶。这一点与蛋清溶菌酶不同^[8]。

我们还用类似的方法直接从培养液中得到了酶结晶,从而为提取此酶提供了经济快速的手段。从培养液中直接结晶同样受 pH 值、温度、盐浓度及结晶时间的影响。直接结晶的最适条件为 pH11.5,温度 25°C,氯化钠 6%,四天结晶完全。酶的结晶形状有二种,pH 低于 10.5 形成杆形结晶(图 5-3),pH 高于 10.5 则形成片形结晶(图 5-4)。当把这种结晶分别溶于 pH4.5 的醋酸盐缓冲液中,再用加氯化钠和调 pH 的方法进行重结晶,均获得麦捆状的针形结晶(图 5-5),即与从粗酶制品中得到的相同。无论是从粗酶制品得到的,还是从培养液中直接得到的结晶,于 4°C 冰箱长时间放置后,均变成长方形的结晶(图 5-6)。在白血病人尿溶菌酶的结晶中也有此现象^[9]。关于溶菌酶结晶的多形性已多见报道^[10,11],这种现象不仅见于同族系酶中的各酶之间,如鸡、鸭、人

表 2 pH 对酶结晶的影响

Table 2 Effect of pH on enzyme crystallization

pH	8.5	9.0	9.5	10.5	11.5
结晶酶活性占总酶活性的百分比(%) Enzyme activity of crystals (%) Total enzyme activity (%)	23.6	32.0	36.7	45.1	50.8

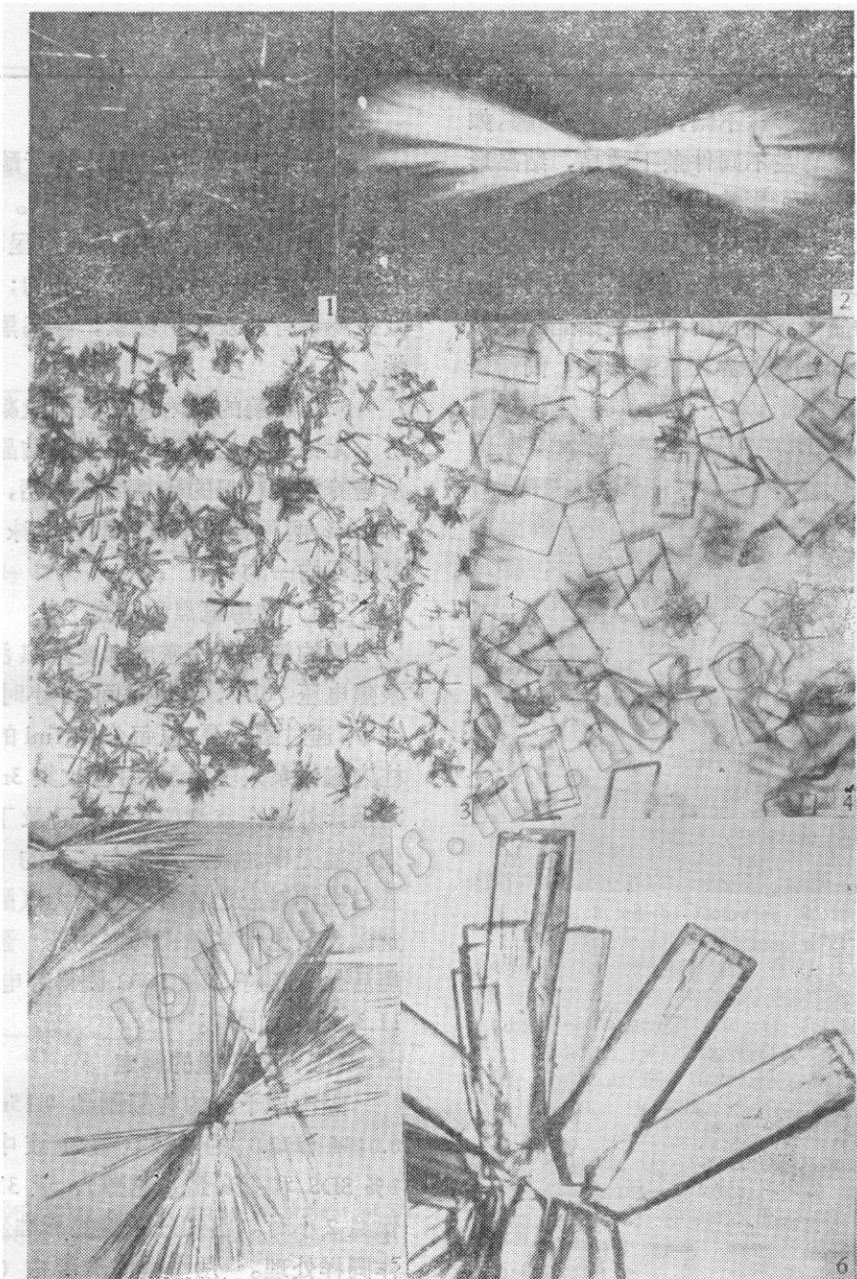


图5 U_{23} 细菌溶解酶结晶的偏光显微镜照片

Fig. 5 Polarizing microphotograph of U_{23} bacteriolytic enzyme crystals

1. 从酶液获得的结晶
Crystals from enzyme at pH 9.2 ($\times 320$)
2. 从酶液获得的结晶
Crystals from enzyme at pH 11.0 ($\times 800$)
3. 从培养液中直接获得的结晶
Crystals from culture filtrates at pH 9.0, ($\times 320$)
4. 从培养液中直接获得的结晶
Crystals from culture filtrates at pH 11.0 ($\times 320$)
5. 从培养液中获得结晶之重结晶
Recrystallized from culture filtrates at pH 11.0 ($\times 320$)
6. 于 4°C 放置四周后的结晶
Crystals deposited for four weeks at 4°C ($\times 800$)

的溶菌酶结晶形状不同,而且同一种酶,如鸡蛋清溶菌酶在不同条件下结晶,结晶形状达六种之多。影响结晶形状的因素主要有蛋白浓度、缓冲液的 pH、温度、沉淀盐的种类、少量重金属离子、染料以及其它一些微量物质等。至于溶菌酶结晶的形状为什么会如此受外界因素的影响,尚待研究。

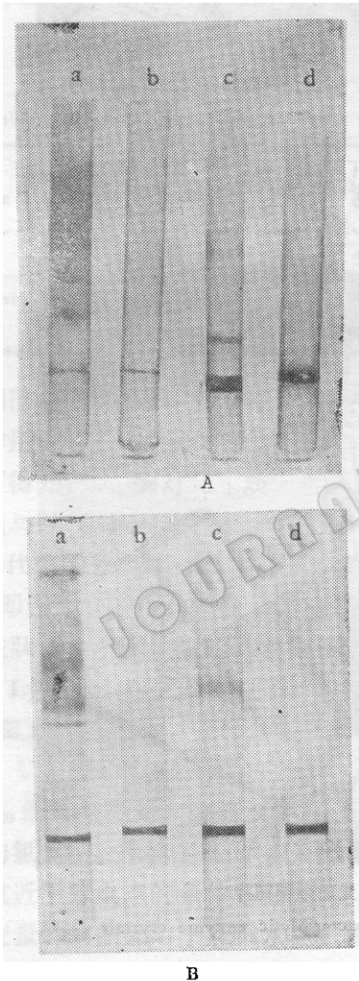


图6 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 6 Polyacrylamide gel electrophoretic patterns

- A: pH 4.3, 7% 凝胶 Gel
 B: pH 4.3, 10% 凝胶 Gel
 a. 培养液 Culture filtrates
 b. 培养液重结晶 Recrystallized from culture filtrates
 c. 粗酶液 Crude enzyme
 d. 酶结晶 Enzyme crystals

2. 酶结晶的证明

对于所获得的酶结晶除进行酶活性的测定外,还做以下简易的观察^[12]。首先是目测,摇动试管,管内的结晶应呈现丝光,不定形固体物质一般是无丝光的;偏光显微镜观察有弱双折射现象;氨基黑染色阳性。

3. 结晶酶的聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳

无论是从粗酶中获得的酶结晶,还是从培养液中获得的酶重结晶样品,在 7.5% 和 10% 两种凝胶浓度的酸性电泳系统中都呈现均一的带。

(四) 酶等电点的测定

酶的等电点用密度梯度聚焦法测定。聚焦电压 700V,聚焦时间 48 小时。聚焦完毕,通过蠕动泵,以每分钟 1ml 的流速把柱内容物泵入收集器,每管收集 3ml,中间流经紫外蛋白监测仪,自动记录下 280nm 处的透光率曲线。并测定各管的 pH 及与蛋白峰相对应之各管的酶活力(酶活性测定以金黄色葡萄球菌为底物)。蛋白峰与酶活性峰相符。在 10°C 测得等电点 pI 为 11.3,结果如图 7。

(五) 分子量的测定

经冷冻干燥的纯酶制品 0.15mg 溶于 0.01M pH7.0 的磷酸盐缓冲液中(内含 1% SDS 和 1% 巯基乙醇),于 37°C 水浴保温 2 小时。已知分子量的标准蛋白质也作同样处理。用牛血清清蛋白(分子量 68,000)、卵清蛋白(43,000)、胃蛋白酶(34,500)、胰蛋白酶(24,000)和核糖核酸酶(14,000)作标准样品制作标准曲线。由 U_{23} 酶的相对迁移率 (R_m),查出其分子量是 27,000,(见图 8)。

根据本文及前文的实验结果,证明 U_{23} 酶是属于所谓能溶解金黄色葡萄球菌的糖苷酶类型的细菌溶解酶中的一种。已见报道的这类酶有数种^[13],这类酶与同属于糖

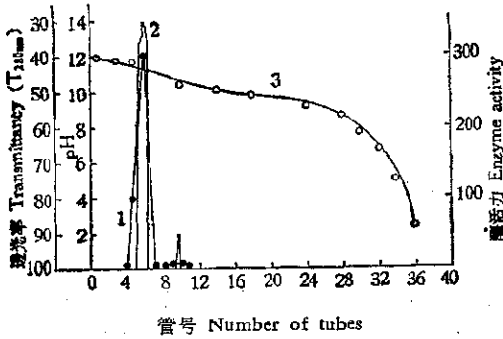


图7 密度梯度聚焦法测 U_{23} 细菌溶解酶的等电点

Fig. 7 Estimation of U_{23} bacteriolytic enzyme pI by electrofocusing in density gradients

1. 酶活 Enzyme activity
2. 蛋白 Proteia 3. pH

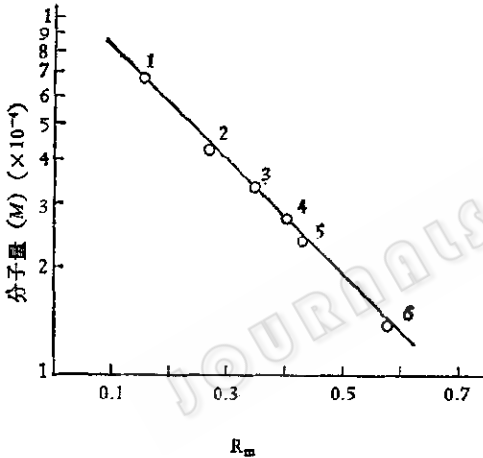


图8 用 SDS 电泳法测定 U_{23} 细菌溶解酶的分子量

Fig. 8 Estimation of the molecular weight of U_{23} bacteriolytic enzyme by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

- 1 牛血清清蛋白 Bovine serum albumin
- 2 卵清蛋白 Egg albumin
- 3 胃蛋白酶 Pepsin
- 4 U_{23} 细菌溶解酶 U_{23} bacteriolytic enzyme
- 5 胰蛋白酶 Trypsin
- 6 核糖核酸酶 RNase

苷酶类型的 Lysozyme 也不同。这类酶的共同特点是能够解开含有 2-N, 6-O 二乙酰

基胞壁酸的糖链, 而对糖链中乙酰氨基己糖 C_3 上不连有酰胺肽链的几丁质则没有作用。另一方面这些酶之间在溶菌谱、分子量、等电点等一些性质上又互有不同。 U_{23} 酶的溶菌谱是比较广的^[1], 仅次于其中的 lysozyme Ch 和 *Streptomyces albus* GF₁ 酶; 分子量比较大 (lysozyme Ch 22,000, 据报道 F₁ 酶是低分子量, 未见数据)。等电点与两者的差别更大 (lysozyme Ch 是 pH7.5; F₁ 酶是 pH6.5)。这些既紧密相关又互有差异的壁溶解酶对于我们进一步深入探讨细菌细胞壁的细微结构将是有用的。

参 考 文 献

- [1] 江慧修等: 微生物学报, 20(4): 390, 1980.
- [2] Ghuyssen, J. -M. et al.: in "Methods in enzymology" Vol 8 ed by Neufeld E. F. and V. Ginsburg, Academic Press, p. 686, 1966.
- [3] Ashwell, G.: in "Methods in enzymology" Vol. 3, ed by Colowick S. P. and N. O. Kaplan, Academic Press, p. 86, 1957.
- [4] 何忠效: 微生物学通报, 6(1): 35, 1979.
- [5] 王杨声: 微生物学通报, 5(6): 33, 1978.
- [6] Strominger, J. -I. and J. -M. Ghuyssen: *Science*, 156: 213, 1967.
- [7] Hash, J. H.: in "Lysozyme" ed by Osserman E. F. et al., Academic Press, p. 95, 1974.
- [8] Alderton G. and H. L. Fevold: *J. Biol. Chem.*, 164: 1, 1946.
- [9] Osserman, E. F.: *Science*, 155: 1536, 1967.
- [10] Jolles, P. et al.: in "Lysozyme" ed by Osserman E. F. et al., Academic Press, p. 31, 1974.
- [11] King, M. V. et al.: *Acta Crystallogr.*, 9: 460, 1956.
- [12] 李钦: 微生物学通报, 5(5): 32, 1978.
- [13] 船津 胜、鹤 大典: "溶菌酵素", 讲谈社 p. 91, 1977.

CHARACTERIZATION OF U₂₃ BACTERIOLYTIC ENZYME

Jiang Huixiu Li Yue Xu Hao

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The products of U₂₃ bacteriolytic enzyme acting on *B. subtilis* AS 1.397 cell wall were analysed. It was shown that U₂₃ enzyme is a bacteriolytic enzyme belonging to the type of glycosidase. This enzyme has no capacity for lysing chitin. The molecular weight and isoelectric point of the enzyme are

27,000 daltons and pH 11.2 respectively. The crystals of U₂₃ enzyme appear polymorphism, similar to the phenomenon seen in lysozyme by other authors. Three kinds of crystals were obtained, depending on conditions for enzyme crystallization.