

脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶的理化及酶学特性

陈锦英* 刘秉阳

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所,北京)

包幼迪

(福建医学院,福州)

本文对临床分离的脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*) 55 的 β -内酰胺酶进行了理化及酶学特性的研究。该酶为非诱导性,以头孢菌素酶活性为主,分子量为 43000,等电点 pI 为 4.95,酶反应最适 pH 为 7.2,最适温度为 37°C。该酶对各种底物的 $K_m(\mu\text{mol/L})$ 值为:头孢噻吩 185,头孢噻啶 103,头孢唑林 200,头孢羟唑 263,头孢氧哌羟苯唑 830。对各种底物的相对水解率为头孢羟唑 > 头孢噻吩 > 头孢唑林 > 头孢噻啶 > 头孢氧哌羟苯唑 > 青霉素 > 羧苄青霉素 > 头霉素甲氧噻吩 > 羟羧酰胺菌素。该酶对羧苄青霉素、头霉素甲氧噻吩、青霉烷砜、对氧安息香酰胺及邻氯青霉素的抑制作用敏感。

关键词 脆弱拟杆菌; β -内酰胺酶; 酶促反应动力学

实践证明,克服细菌耐药性和筛选有效治疗药物的前提是对细菌耐药机制的研究,厌氧菌也不例外。已有的研究表明,脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶的检出率为 30—100%^[1]。许多学者推测该酶具有种属特异性,但缺乏有力的佐证。脆弱拟杆菌的 β -内酰胺酶与革兰氏阴性杆菌染色体编码的 I 类酶,有些相似又不完全相同,对这两类酶相互之间的关系尚未进行深入的研究。国外有关脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶的工作虽屡有报道,但国内尚属空白。本文将临床分离的脆弱拟杆菌的 β -内酰胺酶进行提取,并对其理化及酶学特性进行了研究。

材料与方 法

(一) 菌株

B. fragilis 55 为兰尾炎手术标本分离的菌株,对 β -内酰胺抗生素 MIC 测定结果如下 ($\mu\text{g/ml}$): 青霉素 (Penicillin)

> 128、羧苄青霉素 (Ampicillin) > 128、羧苄青霉素 (Carbencillin) > 128、苯唑青霉素 (Oxacillin) > 128、邻氯青霉素 (Cloxacillin) 128、头孢噻吩 (Cephalothin) > 128、头孢噻啶 (Cephaloridine) > 128、头孢唑林 (Cefazolin) > 128、头孢环己烯 (Cepharidine) > 128、头孢羟唑 (Cefamandole) > 128、头霉素甲氧噻吩 (Cefoxitin) 16、头孢呋肟 (Cefuroxime) 64、头孢去甲噻肟 (Ceftizoxime) 16、头孢三嗪噻肟 (Ceftriaxone) 32、头孢噻甲羧肟 (Ceftazidime) > 128、头孢氧哌羟苯唑 (Cefoperazone) 64、羟羧酰胺菌素 (Moxalactam) 4。

(二) 粗酶制备物

按文献[1]的方法进行。

(三) β -内酰胺酶的检测

本文于 1989 年 1 月 23 日收到。

* 中国预防医学科学院 85 届研究生,现在天津医学院微生物学教研室工作。

采用紫外分光光度法用于酶动力学的研究。反应系统中头孢菌素类的浓度为 0.1 mmol/L, 青霉素和氨苄青霉素的浓度为 1 mmol/L。各种底物所用的波长 (nm) 如下: 头孢噻吩 262、头孢噻啶 255、头孢唑啉 263、头霉素甲氧噻吩 272、头孢羟唑 274、羟羧氧酰胺菌素 274、头孢氧哌羟苯唑 276、青霉素 233, 氨苄青霉素 235^[1]。

(四) β -内酰胺酶理化特性的研究

1. 分子量测定: 纯化的酶蛋白采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法, 以低分子量标准蛋白试剂做分子量对照^[1]。

2. 等电点 (pI) 测定^[2]: 等电聚焦电泳以玻璃板做为支持物的聚丙烯酰胺凝胶上进行, 凝胶组成如下: 丙烯酰胺 75 mg/ml, N,N-甲叉双丙烯酰胺 2 mg/ml、两性电解质 (LKB Roman pH3.5—10) 16 mg/ml、过硫酸铵 0.5 mg/ml、TEMED 1.67 μ l/ml。采用 LKB 等电聚焦电泳装置, 电泳条件: P = 30W, U = 1500V, I = 50 mA, 10 $^{\circ}$ C 电泳 1.5 小时。用 Nitrocefin 进行染色, 将 Nitrocefin 溶液浸湿的 Whatman 滤纸置于凝胶表面, 随即取走滤纸, 凝胶表面有红色的 β -内酰胺酶带出现。

3. β -内酰胺酶氨基酸组成分析: 纯化的酶蛋白 1 mg 经 6 mol/L HCl 110 $^{\circ}$ C 水解 22 小时, 然后用氨基酸自动分析仪 (日立 83550) 进行测定, 并计算其含量。

(五) β -内酰胺酶促反应的动力学^[3,4]

1. 米氏常数 (K_m) 的测定: 以各种不同浓度的底物反应系统测定相应的反应速度, 然后用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求 K_m 。

2. 对各种底物水解率的比较 (V_{max}): 参照施耀国等方法^[5], 比较各种底物反应系统加入酶液前后 OD 值的变化, 以酶作用前 OD 值为 100% 计算相应底物的相对水解率。

3. pH 和温度对酶反应速度的影响: 用紫外分光光度法以头孢噻啶为底物分别在 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 和 42 $^{\circ}$ C 不同条件下测定酶活性。

选择不同缓冲液反应系统观察 pH 对酶活性的影响, 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH5.5); 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2); 0.1 mol/L Tris-HCl (pH8.8)。三种缓冲液均加入 KCl, 终浓度为 0.3 mol/L, 以避免离子强度不同的影响。仍以头孢噻啶为底物用紫外分光光度法测定酶活性。

4. 抑制剂对酶反应的影响: 选用棒梭 (Clavulanic acid)、青霉素砒 (Sulbactam)、头霉素甲氧噻吩、羧苄青霉素、邻氯青霉素和对氯安息香酸汞 (*p*-Chloromercuric benzoate, PCMB) 做为抑制剂。将酶液分别与各种抑制剂 37 $^{\circ}$ C 预温 5—10 min, 然后加入头孢噻啶底物系统, 比较加入抑制剂前后 OD 值的变化。根据相对水解率计算加入抑制剂后底物水解百分数的减少。试验中各种抑制剂的浓度除对氯安息香酸汞为 50 μ mol/L 外, 其余均为 1 mmol/L。

5. β -内酰胺酶的诱导性: *B. fragilis* 55 过夜培养物转种于脑心浸液培养基中, 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 2 小时, 分别加入氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 和头霉素甲氧噻吩 (2 μ g/ml), 继续培养 6 小时, 制备粗酶提取物, 比较加诱导剂与未加诱导剂酶活性的变化。

结 果

(一) *B. fragilis* 55 β -内酰胺酶的理化特性

1. 细菌生长与产酶的关系: 于不同培养时间取出菌液测 OD₆₀₀, 绘制生长曲线, 并进行粗酶提取及 β -内酰胺酶活性测定。

产酶量最大为转种培养开始后的 12 小时, 即对致生长后期, 但应严格掌握转种时菌液的接种量。

2. 分子量和等电点的测定: 纯酶经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量为 43000。鉴于纯酶和粗酶制备物电泳后酶染色均为单带, 纯酶在聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上也均为

表 1 脆弱拟杆菌 55 β -内酰胺酶的氨基酸分析结果
Table 1 Analysis of amino acid composition for β -lactamase of *Bacteroides fragilis* 55

氨基酸 Amino acid	mol	%
丙氨酸 Alanine	3.362	8.8
缬氨酸 Valine	3.272	8.6
亮氨酸 Leucine	3.284	8.6
异亮氨酸 Isoleucine	3.260	8.5
脯氨酸 Proline	1.214	3.2
苯丙氨酸 Phenylalanine	2.085	5.4
甘氨酸 Glycine	5.030	13.2
丝氨酸 Serine	1.018	2.7
苏氨酸 Threonine	1.661	4.3
半胱氨酸 Cysteine	0.205	0.5
赖氨酸 Lysine	3.236	8.5
精氨酸 Arginine	1.102	2.9
天冬氨酸 Aspartic acid	3.827	10.0
谷氨酸 Glutamic acid	5.309	13.9
其它 Others	0.364	0.9
合计 Total	38.229	100.0

单带, 提示该酶为单体组成^[1]。粗酶制备物等电聚焦电泳以带有质粒 RP4 的大肠杆菌粗酶制备物为对照, Nitrocefim 染色为单带, pI 为 4.95。

3. 氨基酸组成: 本法不能测得色氨酸, 组氨酸峰和 NH_3 峰相重叠, 故无法计算, 天门冬酰胺和谷氨酰胺水解后分别为天门冬氨酸和谷氨酸。测定结果见表 1。

(二) β -内酰胺酶促反应动力学

1. K_m 测定: 以头孢噻吩、头孢噻啶、头孢唑啉、头孢羟唑和头孢氧唑羟苯唑为底物测定粗酶提取物的 K_m 值, 见表 2。

2. 各种底物相对水解率 (V_{max}) 的测定: 选用 9 种抗生素做为底物, 以头孢噻啶的水解率为 100%, 比较粗酶提取物对各底物的相对水解率 (表 2)。结果表明头孢羟唑对这种酶最敏感, 羧基氧酰胺菌素对这种酶的稳定性最高。

3. 酶反应的最适 pH 和温度: 以酶促反应的初速度比较不同反应系统的酶活性, 结果表明 *B. fragilis* 55 β -内酰胺酶的最适反应温度为 37°C, 最适 pH 为 7.2。

4. 抑制剂对酶反应的影响: 在试验所用的浓度下 6 种抑制剂 (除羧基青霉素外) 均可抑制酶水解活性达 55% 以上, 羧基青霉素抑制酶活性 41% (见表 2)。其中对氯安息香酸汞为巯基抑制剂, 推测该酶的活性部位可能有半胱氨酸残基。

5. β -内酰胺抗生素对酶的诱导作用: 利用对该酶敏感的氨基青霉素和对该酶具有稳定性的头霉素甲氧唑吩做为诱导剂, 测定前者的酶比活力为 0.27, 后者为 0.09, 未加诱导剂者为 0.22。氨基青霉素增加酶比活力 22.7%, 头霉素甲氧唑吩减少酶比活力 59.1%, 表明这种酶为非诱导性 β -内酰胺酶。

讨 论

对一般临床分离的脆弱拟杆菌的分析结果表明, 这类细菌的 β -内酰胺酶以水解头孢菌素占优势故常称为头孢菌素酶, 该酶属于非诱导性的细胞结合酶, 已有证据

表 2 脆弱拟杆菌 55 β -内酰胺酶促反应动力学的测定结果Table 2 β -Lactamase reaction kinetics of *Bacteroides fragilis* 55

抗生素 Antibiotic	相对水解率 V_{max} (%)	米氏常数 K_m ($\mu\text{mol/L}$)	抑制剂降低 β -内酰胺酶对头孢噻啶水解的百分率 Reduction percentage of β -lactamase hydrolysis to cephaloridine by various inhibitors					
			邻氯青霉素 Cloxa- cillin	对氯安息 香酰胺 PCMB	青霉烷砜 Sulbactam	棒酸 Clavulanic acid	羧苄青霉素 Carbenici- llin	头孢甲氧 噻吩 Cefoxitin
头孢噻吩 Cephalothin	113	185						
头孢噻啶 Cephaloridine	100	103	55	65	59	66	41	80
头孢唑啉 Cephazolin	104	200						
头孢甲氧噻吩 Cefoxitin	3							
头孢羟唑 Cefamandole	119	263						
羟羧氧苄胺菌素 Moxalactam	3							
头孢氧哌羟苯唑 Cefoperazone	88	830						
青霉素 Penicillin	25							
氨苄青霉素 Ampicillin	17							

表明该酶位于浆周腔中, 仅 Olsson 等报告有 50% 酶活性为胞外酶。酶的分子量为 29000—43000, 其等电点为 4.6—5.1, 绝大多数为 4.9^[6,7]。本文对 *B. fragilis* 55 β -内酰胺酶特性进行了全面的研究, 与国外报道大致相同, 但氨基酸组成分析尚属首次报道。这株菌隐蔽性数值测定为 43.8^[8], 属于非诱导性细胞结合的头孢菌素酶, 分子量为 43000, pI 为 4.95。该酶的分子量与 Britz 等报告的 *B. fragilis* AM78 β -内酰胺酶 (分子量 28500—30000) 不同^[9], 而与 Olsson 等报告 *B. fragilis* B70 β -内酰胺酶 (分子量 43000) 相同^[7]。

鉴于前人已证明粗酶提取物、部分纯化酶和纯酶进行酶促反应动力学研究的结果基本一致, 我们选择 *B. fragilis* 55 β -内酰胺酶的粗酶提取物进行酶动力学测定,

以避免纯化过程中酶活性丢失造成的影响。*B. fragilis* 55 β -内酰胺酶的 K_m 和 V_{max} 测定结果与国外资料相比较, 其差别在于对头孢羟唑的水解率。均以头孢噻啶的水解率为 100% 进行比较, Darland 等报告为 16—24%^[10], Olsson-Liljequist 等报告为 17—20%^[11], 而本文结果为 118.7%, 其它底物的水解率大致相似, 提示该类酶可能存在某种程度的异质性。此外, 所有研究都表明脆弱拟杆菌的 β -内酰胺酶活性与细菌的生长周期密切相关, 以对数生长后期或静止前期酶的活性最高, 确定细菌生长周期的时间与转种菌量关系极大, 若按 1% 转种量也可培养 18 小时后收获, 若 3—5% 转种量则培养 10—12 小时酶活性最高^[9,10,12], 本文采用后者。

脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶不同于革兰

氏阴性杆菌染色体介导的 I 类酶, 突出的特点在于对抑制剂的敏感性不同, 后者对对氯安息香酸汞、棒酸和青霉烷砜的抑制均不敏感, 而脆弱拟杆菌的 β -内酰胺酶对棒酸、对氯安息香酸汞、青霉烷砜、邻氯青霉素、羧苄青霉素和头霉素甲氧噻吩的抑制均敏感, 这将有利于广谱酶抑制剂的研究和临床应用。对对氯安息香酸汞的敏感性提示, 试验过程中可使用巯基保护剂(2-巯基乙醇或二巯苏糖醇)以保护酶活性而有利于操作^[13,14]。

本文和国外研究的资料均表明脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶与 Richmond 和 Sykes 分类的革兰氏阴性杆菌 I 类酶有区别, 归于第 VI 类酶。这类酶未见有传递成功的报道, 一般推测有关基因位于染色体上^[15]。

参 考 文 献

[1] 陈锦英等: 中华微生物学和免疫学杂志, 9: 269,

1989。

- [2] Matthew, M.: *J. Gen. Microbiol.*, 83: 159—175, 1975.
- [3] 吴经才等(译): 生物化学计算, 科学出版社, 北京, p. 156, 1984。
- [4] 沈同等: 生物化学, 高等教育出版社, 北京, p. 232, 1980。
- [5] 施耀国等: 抗生素, 10: 263—268, 1985。
- [6] Nord, C. E.: *Rev. Infect. Dis.*, 8(Suppl 5): S543—548, 1986.
- [7] Olsson, B. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9: 727—735, 1976.
- [8] 陈锦英等: 中华微生物学和免疫学杂志, 10: 50—53, 1990。
- [9] Britz, M. L. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13: 373—382, 1978.
- [10] Darland, G. et al.: *Ibid.*, 11: 725—734, 1977.
- [11] Olsson-Liljequist, B. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 18: 220—225, 1980.
- [12] Simpson, I. N. et al.: *J. Antimicrob. Chemother.*, 9: 29—45, 1982.
- [13] Fekete, T. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31: 321—322, 1987.
- [14] Rolinson, G. N.: 抗生素 12: 171—182, 1987.
- [15] Bauernrind, A.: *Rev. Infect. Dis.*, 8(Suppl 5): S470—481, 1986.

PHYSICO-CHEMICAL AND ENZYMOLOGICAL PROPERTIES OF β -LACTAMASE FROM *BACTEROIDES FRAGILIS*

Chen Jinying Liu Bingyang

(Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Preventive Medicine, Beijing)

Bao Youdi

(Fujian Medical College, Fuzhou)

Bacteroides fragilis 55 from clinical specimens was selected at random for β -lactamase investigation of physico-chemical and enzymological properties. The enzyme was characterized as a cell-associated cephalosporinase with some penicillinase activity, the molecular weight of the enzyme being 43000 and the pI 4.95. It could be inhibited by cefoxitin, PCMB, carbenicillin, sulbactam, clavulanic acid and cloxacillin. The optimum

pH and temperature for enzyme reactions have been found to be 7.2 and 37°C, respectively. The analysis of amino acid composition and parameters of enzyme kinetics has been described.

Key words

Bacteroides fragilis; β -Lactamase; Enzyme reaction kinetics