

- practice. New York: Marcel Dekker Inc, 1974: 662—672
- 2 Tien H Ti 著, 肖 科译. 人造双分子层膜. 北京: 高等教育出版社, 1987: 59—71
- 3 田心棣. 化学通报, 1989; 7: 1
- 4 邵子厚, 杨昌正. 生物化学与生物物理进展, 1992; 19 (4): 306
- 5 邵子厚, 李 邨, 杨昌正. 生物化学与生物物理进展, 1992; 19 (5): 391
- 6 Tai Zihou, Zhang Gengcheng, Qian Xiangping. Langmuir, 1993; 9: 1601
- 7 邵子厚, 余宝源, 朱德煦. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16 (5): 365
- 8 Moellerfeld J, Prass W, Ringsdorf H *et al.* Biochim Biophys Acta, 1986; 857: 265
- 9 Janas T, Kotowski J, Tien H Ti. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1988; 19: 405
- 10 大勝靖一, 阿部克也. 化学工業, 1988; 1: 68
- 11 Muller P, Rudin D O. Nature, 1967; 213: 603
- 12 Pant H, Rosenberg B. Biochim Biophys Acta, 1971; 225: 379
- 13 Yoshikawa K, Fujimoto T, Shimooka T *et al.* Biophys Chem, 1988; 29: 293
- 14 Yoshikawa K, Matsubara Y. J Am Chem Soc, 1984; 106: 4423

工程菌噬菌体 T7 溶菌酶的纯化和性质*

华 陵 李殿君 许永瑞 钮择玲 崔道珊

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 用崔道珊等构建的噬菌体 T7 溶菌酶工程菌株, 培养物经超声破碎和 DE52, CM52 柱层析纯化, 我们得到电泳纯的 T7 溶菌酶, 分子量为 17000, 最适反应 pH 为 8.0. 其热稳定性欠佳, 保温 37℃, 5min 即丧失酶活 21%.

关键词 噬菌体 T7 溶菌酶, 纯化, 性质

溶菌酶广泛存在于自然界, 已知从最低等的病毒到人体的各器官、组织都含有溶菌酶. 由于这种酶能选择性地使对象微生物细胞壁溶解, 从而对生物体本身有保护作用. 通过对各种来源的溶菌酶进行比较研究, 发现不同来源的酶功能相似, 但作用机理有所差异, 目前将这类细胞壁溶菌酶分为糖苷酶型与肽和酰胺型两大类, 前者以卵清溶菌酶为代表, 后者以噬菌体 T7 溶菌酶为代表. 随着目前人类对用天然无毒防腐剂来代替有害健康的化学防腐剂及对无毒副作用的消毒剂、抗菌药的强烈要求, 探讨和研制具有食品防腐和医用价值的天然无毒蛋白已成为当前生物化学研究的重要课题, 溶菌酶无疑是一种有希望的研究对象. 我们选择了目前尚未进行过深入研究的噬菌体 T7 溶菌酶为目标, 利用崔道珊等^[1,2]构建的噬菌体 T7 溶菌酶工程菌株, 得到纯的噬菌体 T7 溶菌酶,

对其性质进行了一些研究测定.

1 材料和方法

1.1 材料

卵清溶菌酶为美国 Sigma 公司产品; Whatman DE52 及 Whatman CM52 系英国 Whatman 公司产品; IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) 诱导剂为美国 Sino-American Biotec. 公司产品; MES (2-N-吗啡啉乙磺酸) 为中国科学院生物化学研究所产品; 其它实验中使用的常用化学试剂均为国产分析纯或电泳纯产品.

1.2 制备溶菌酶测活底物

1.2.1 大肠杆菌 *E. coli* B 接种于 10ml TB 培养液中, 37℃ 摇荡过夜, 次日 1:200 稀释,

*国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1992-10-14, 修回日期: 1993-02-08

4×200ml 新鲜 TB 培养液 37℃ 摇荡培养, 当 $A_{600}=0.6$ 时停止培养, 离心收集菌体, 再用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 洗两次, 离心收集菌体, 用总共 1ml 上述缓冲液洗菌糊并转移到冷冻干燥瓶中, -20℃ 冰冻一周后减压冷冻干燥, 收集干粉, 密封保存。

1.2.2 溶壁微球菌 10ml M9TB 培养液 + 50 μ l 冷冻存储菌, 于 32℃ 摇荡过夜. 次日 1:100 稀释, 于 4×100ml 新鲜 M9TB 培养液中, 32℃ 摇荡培养 4h, 离心收集菌体, 菌体用无菌生理盐水洗一次, 再用 50% 丙酮和无水丙酮各洗两次, 得到的菌体于 45℃ 以下烘干, 置密封瓶中保存。

1.3 T7 溶菌酶活力测定

选用密合好的玻璃匀浆器, 滴入少量 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 以润湿管壁, 取适量 *E. coli* B 干粉放匀浆器中, 反复研磨 5min, 研磨时要磨出声音来. 磨好后用上述缓冲液洗出, 并稀释到 450nm 吸光度为 0.7 左右备用. 取此液 3ml 于比色杯中, 读 A_{450} 值, 加入酶液, 立即开始计时, 尽快混匀, 准确测定 A_{450} 降低 0.10 所需时间。

定义在上述标准条件下, 室温 20℃ 时, 平均每分钟吸光度降低 0.001 为 1 个酶活力单位。

酶活力计算:

$$\begin{aligned}\text{酶活力} &= 0.10 / 0.001 \div \text{时间 (min)} \\ &= 100 \div \text{时间 (min)}\end{aligned}$$

可用卵清溶菌酶作为正对照, 检验制备好的底物 *E. coli* B 是否有效. 卵清溶菌酶也可以用溶壁微球菌作为底物, 而用后者为底物时完全测不到 T7 溶菌酶的活力。

2 结果

2.1 酶的分离纯化

按 1:200 将含 T7 溶菌酶克隆的 *E. coli* B 接种到 TB 培养液中, 37℃ 摇床培养至 $A_{600}=0.8$ (大约为 5×10^8 细胞/ml), 加入 IPTG 诱导剂使终浓度为 0.4mmol/L, 继续培养 3—4h, 离心收集菌体 (7 000r/min 15min), 菌体冻溶三

次 (-30℃ : 37℃) 后, 悬浮于适量缓冲液 A (含 20mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1mmol/L 二硫苏糖醇, 5% 甘油, 1mmol/L EDTA) 中, 超声波处理破碎菌体, 离心 15 000r/min 20min, 收集上清, 此即粗提液。

将上述粗提液上 DE52 柱进一步纯化. 该柱预先用缓冲液 A + 10mmol/L NH_4Cl 充分平衡, 上样后用上述液洗柱, 收集并合并流出液中有酶活部分, 见图 1。

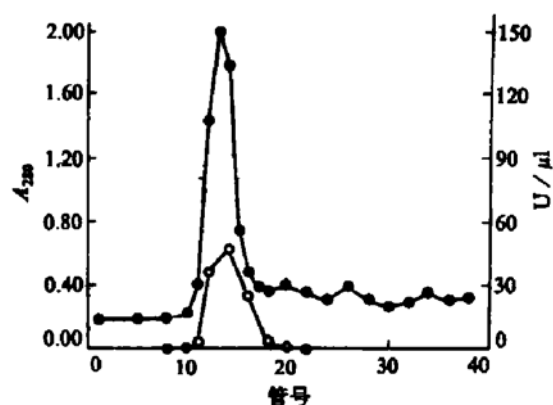


图 1 T7 溶菌酶在 DE52 柱上的洗脱

●—● A_{280} ; ○—○ 酶活

将此 DE52 下柱液用 0.1mol/L MES 调 pH 到 6.0 后, 再上一 CM52 柱再一次纯化. 该柱预先用缓冲液 B (含 10mmol/L MES-NaOH, pH6.0, 20mmol/L NaCl, 1mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 5% 甘油) 充分平衡, 上样后用一倍柱体积的缓冲液 B 淋洗柱子, 然后用

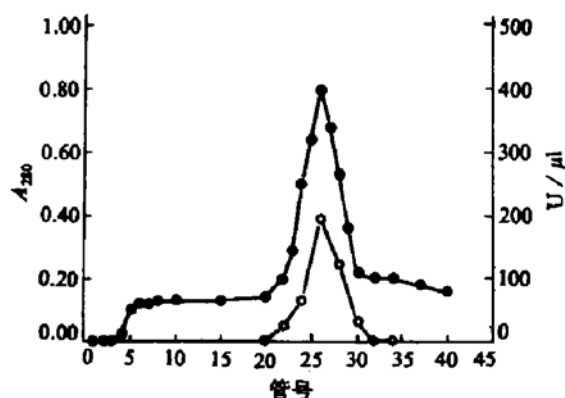


图 2 T7 溶菌酶在 CM52 柱上的洗脱

●—● A_{280} ; ○—○ 酶活

20—520mmol/L NaCl 溶液做梯度洗脱, 溶菌酶在 NaCl 浓度 0.25mol/L 左右下柱, 结果见图 2. 收集并合并此部分有酶活的流出液, 装透析袋, 先对聚乙二醇反透析适当浓缩体积, 再对缓冲液 C (含 40mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 100mmol/L NaCl, 8mmol/L MgCl₂, 1mmol/L DTT, 50% 甘油) 透析, 备用.

各步骤纯化结果见表 1, 1L 培养液可获纯酶 26mg, 比活为 2.06×10^5 U/mg. 纯酶可浓缩到 3mg/ml 以上. 所示数据中粗提液部分和 DE52 柱后部分的酶活力测定偏低, 大约是因为此 T7 溶菌酶受某种抑制剂的影响, 这种抑制剂是可以被阳离子交换柱除去的, 所以经 CM52 柱后总酶活得到了很大提高. 这些数据是充分可靠的, 经两次实验反复测定规律相同.

表 1 T7 溶菌酶的纯化

步 骤	总活力/U	总蛋白/ A_{280}	比活/ (U/ A_{280})
粗提液	484×10^4	1080	4.48×10^3
DE52 层析	67.8×10^4	39.5	17.2×10^3
CM52 层析	430×10^4	20.9	206×10^3

注: 来自 1L 培养液.

2.2 酶纯度的检查

纯化后的样品经 SDS-PAGE 检查为单一泳带, 见图 3.

酶的水溶液的最大紫外吸收峰在 279nm, $A_{280}/A_{260} = 1.81$, 其紫外吸收光谱见图 4.

2.3 酶的分子量

用 SDS-PAGE 测出酶的分子量为 17 000.

2.4 酶的最适反应 pH

在 Tris-HCl 缓冲液和巴比妥缓冲液中, 此酶的最适反应 pH 均为 8.0. 在磷酸缓冲液中此酶的反应活性欠佳. 见图 5.

2.5 酶的热稳定性

将酶液分别于 5℃, 20℃, 37℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃ 保温 5min, 然后测定酶活, 结果见图 6. 可见此酶的热稳定性不够理想.

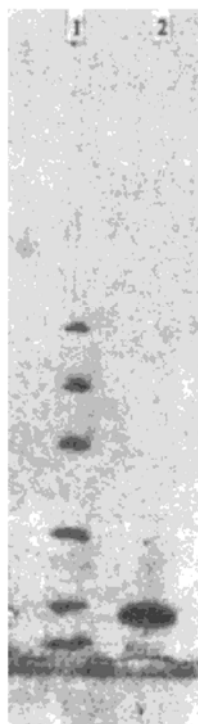


图 3 T7 溶菌酶的 SDS-PAGE

1. 分子量标准 (A—F 自上而下):

- A. 磷酸化酶
- B. 白蛋白
- C. 卵白蛋白
- D. 碳酸酐酶
- E. 胰蛋白酶抑制剂
- F. β -乳白蛋白酶

2. T7 溶菌酶

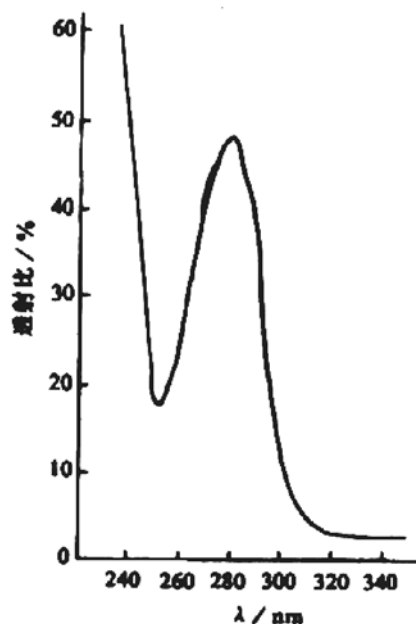


图 4 T7 溶菌酶的紫外吸收光谱

3 讨论

使用崔道珊等克隆^[1]和构建^[2]的噬菌体 T7 溶菌酶工程菌, 经发酵培养, 分离纯化了噬菌体 T7 溶菌酶. 纯化后的该酶最适反应 pH 在 8.0, 与 T7 噬菌体感染大肠杆菌得到的溶菌酶的最适反应 pH (7.0) 稍有不同 (见图 5). 作为工程菌有投入生产比较方便, 成本较低的优点, 每 L 培养液可以得到约 26mg 纯的 T7 溶

菌酶。此酶的热稳定性较差(见图6),在pH8保温37℃,5min就损失了21%的酶活,而鸡卵清溶菌酶在pH3保温96℃15min仍能保留87%的酶活^[3]。溶菌酶有较高的特异性^[3],例如卵清溶菌酶只对革兰氏阳性菌有分解作用,对革兰氏阴性菌则无作用;而至少在我们的实验条件下,T7溶菌酶不对溶壁微球菌起作用。

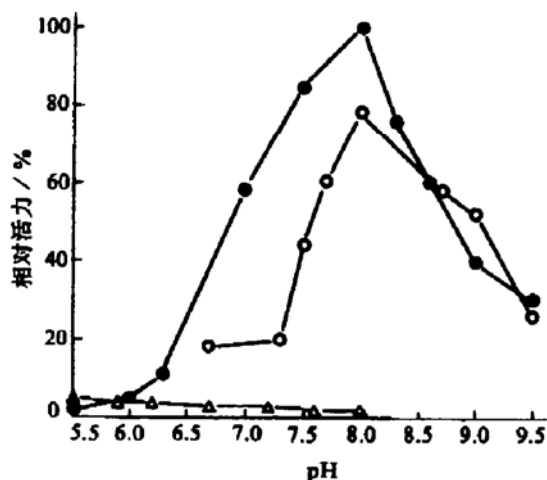


图5 pH对酶活的影响

●—● 0.05mol/L Tris-HCl; ○—○ 0.04mol/L 巴比妥缓冲液; △—△ 0.05mol/L 磷酸缓冲液。

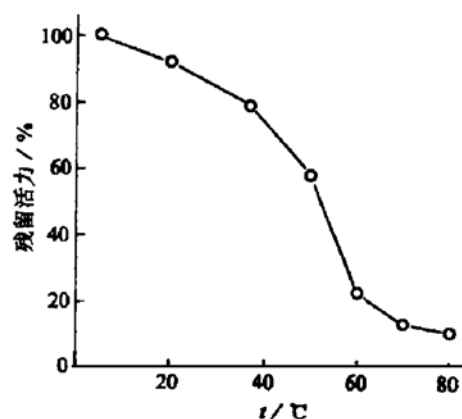


图6 酶的热稳定性

卵清溶菌酶在食品防腐等诸方面已有广泛的应用^[3],而此工程菌T7溶菌酶因热稳定性欠佳,尚需改造后方能应用。

参 考 文 献

- 1 崔道珊,练永宁,许永瑞等.生物工程学报,1990;6(2):91—95
- 2 崔道珊,宋兰芝,许永瑞等.生物工程学报,1991;7(4):328—332
- 3 船津胜,鹤大典(日)编著.溶菌酶.济南:山东科学技术出版社,1982;54,256

(上接第71页)

pH7.0—9.0为Tris-HCl缓冲液,pH10为甘氨酸(Glycine-NaOH)缓冲液,将不同的pH的化酶的最适pH为6.0—9.0,在此范围均表现很高活力,游离酶最适pH为7.0。将游离酶和固定化酶分别与反应液混合4h,在10℃,20℃,30℃,40℃,50℃,55℃的温度下保温20min,测其酶活力。游离酶30℃开始失活,固定化酶40℃开始失活,到50℃时游离酶已无酶活力,而固定化酶仍保持50%的酶活力。由于酶固定化后,与底物的静电作用发生变化,米氏常数也略有变化,在30℃下测定不同反应液初始浓度下的降解邻苯二酚的反应速度,再根据双倒数作图法,得出游离酶的 K_m 为 $2.0\mu\text{mol/L}$,固

定化酶的 K_m 为 $3.0\mu\text{mol/L}$ 。把游离酶及固定化酶置于40℃冰箱中保藏,存放5个月,游离酶活性保存40%,固定化酶活性保存80%。胞外邻苯二酚1,2-双加氧酶经过固定化后,酶与载体结合牢固,制成的固定化酶表现活力高,使用范围比游离酶扩大,耐酸性及耐碱性都有显著提高,并且使用稳定性好,得到的产物浓度及纯度均较高,说明载体对酶有一定的保护作用而且载体的微环境对提高邻苯二酚1,2-双加氧酶的pH适应性有利,固定化酶可以多次反复使用,增加酶的使用次数和寿命,并且酶与产物容易分离,有利于工业化应用。该固定化酶已在本实验室制备顺,顺-己二烯二酸工作中得到了应用,产品质量达到要求。

leaf structure of tRNA^{leu} was showed according to the Holley mode as well as the amount of free energy in the each of stems versus loops.

Key words bovine liver tRNA, nucleotide sequence, cloverleaf structure

The Change of Ca²⁺ in SR and Mit of Isolated Ischemia-Reperfusion Rat Heart. Che Chengri, Li Xiangshan, Jin Jihuan, Wang Mingyong, Li Suxiang, Li Dan. (*Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital, Yian Bian Medical College, Yanji 133000*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 73

The strength of radiation of ⁴⁵Ca²⁺ in sarcoplasmic reticulum vesicle (SR) and mitochondria (Mit) was measured by liquid scintillation counting method. Comparing the effects of ATP - MgCl₂, SOD and verapamil on the ⁴⁵Ca²⁺ concentration in SR and Mit which prepared from isolated ischemia reperfused rat hearts. The result showed that the ⁴⁵Ca²⁺ cpm of SR of the three groups were higher than that of control, while the ⁴⁵Ca²⁺ cpm of Mit of the three groups were lower than that of control. These results suggested that the three kinds of reagent could protect reperfusion injury of heart cell through enhance ⁴⁵Ca²⁺ storage in SR and inhibiting the ⁴⁵Ca²⁺ accumulation in Mit.

Key words ischemia-reperfusion, sarcoplasmic reticulum vesicle, mitochondria, calcium

Novel Properties of Bilayer Membrane Formed by Diazafluorenone Schiff Base Amphiphiles. Tai Zihou, Qian Xiangping, Zou Juan, Zhang Gencheng. (*State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210008*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 76

A new kind of diazafluorenone Schiff base amphiphiles were synthesized. Bilayer membrane formed with these compounds possess good stability and oscillation properties. When 0.1 mol/L AgNO₃ presented in bathing solution and an electrical field was applied on this system, a maximum value of the current, 4.0 μA, was obtained. A possible application in the development is indicated.

Key words diazafluorenone, Schiff base, amphiphile, bimolecular membrane

The Purification and Characterization of Bacteriophage T7 Lysozyme of Recombinant Strains. Hua Ling, Li Dianjun, Xu Yongrui, Niu Zeling, Cui Daoshan. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 79

The culture solution of recombinant strains of lysozyme was treated by ultrasonic wave, purified by DE52 chromatography and CM52 chromatography, a polyacrylamide gel electrophoresis pure T7 lysozyme of Mr 17000 was obtained, the optimal react pH is 8.0, 21% of total enzyme activity lost at 37°C in 5 min.

Key words T7 lysozyme, purification, characterization

Measurement of Creatine Kinase MM Isoforms by Chromatofocusing. Kong Qingyin, Yang Zhenhua, Yang Shude, Tang Zhiyi. (*Dept. of Laboratory Medicine, Beijing Hospital, Beijing 100730*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 83

A rapid and sensitive method of isoforms of CK (EC 2.7.3.2) -MM in human serum by chromatofocusing was reported. The assay system involved Mono P (HR5/20) column, fast protein liquid chromatography (FPLC)