

金黄色葡萄球菌胞外青霉素酶的性质及分型研究

盛 勤 陈知本 陈小英

(中国药科大学生物技术中心, 南京 210009)

摘 要 对七株临床分离之金黄色葡萄球菌 82052、82062、82143、85053、90002、90012 和 S-75 的胞外青霉素酶进行了纯化,测定其分子量及等电点,发现在七种不同的酶中表现出很高的均一性。根据相对水解活性及酶动力学特性研究(包括米氏常数 K_m 、转换数 K_{cat} 和相对水解率 REH),与 Richmond A-D 型酶相比较,得出酶的初步分型。其中 82052、82062、85053 类似于 Richmond A 型酶,82143、90002 类似 Richmond D 型酶,而 S-75 和 90012 分别对应于 Richmond C 和 B 型酶。

关键词 金黄色葡萄球菌; 胞外青霉素酶; 酶促反应动力学; 分型

长期以来, β -内酰胺酶(EC·3·5·2·6)的分类一直是人们所关注的问题,分类依据有底物谱、抑制剂谱、等电点、动力学特征、血清免疫反应等。Richmond 在 1965 年首次将金黄色葡萄球菌的胞外青霉素酶分为 A、B、C 三型^[1],后 Rosdahl 又补充了 D 型酶^[2]。虽然,该分类法的主要依据是酶和抗酶血清的免疫学反应,但各型酶都有特征性酶促反应动力学常数^[3],因此较为明确。本文首次证明了南京地区 Richmond A-D 型酶的存在,不但为进一步研究细菌耐药机制打下基础,而且对临床用药具有一定的指导意义。

1 实验部分

1.1 菌株与试剂

染色体编码的产酶金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)菌株 82052、82062、82143、85053、90002;质粒编码的产酶 *S. aureus* 菌株 90012、S-75。诱导前,上述菌株对青霉素 G 的 MIC 均为 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$,经青霉素 G 梯度诱导后,其 MIC 值($\mu\text{g}/\text{ml}$)除 90012 为 64, S-75 为 128 以外,其余各菌均大于 128,同时胞外青霉素酶产量也有不同程度的提高。

磷酸纤维素 P11(CP, Whatman);羧甲基

纤维素 CM22(CMC, Whatman);葡聚糖凝胶 G-75(Sephadex G-75, Pharmacia);Ampholine (pH3.5~9.5, LKB);IEF Marker (Sigma)。

1.2 *S. aureus* 胞外青霉素酶菌体培养条件及活力测定

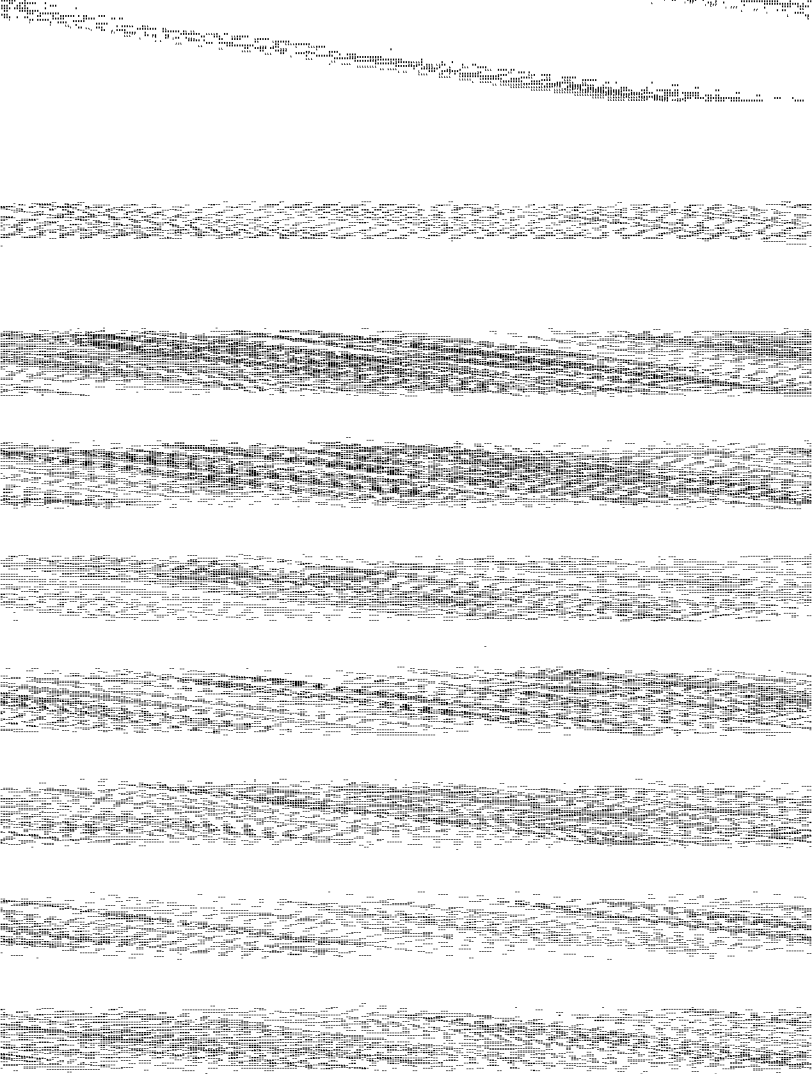
S. aureus 必须在高浓度阴离子存在下才能释放大量的胞外青霉素酶,按文献[4]的方法进行培养,胞外酶产量较高。

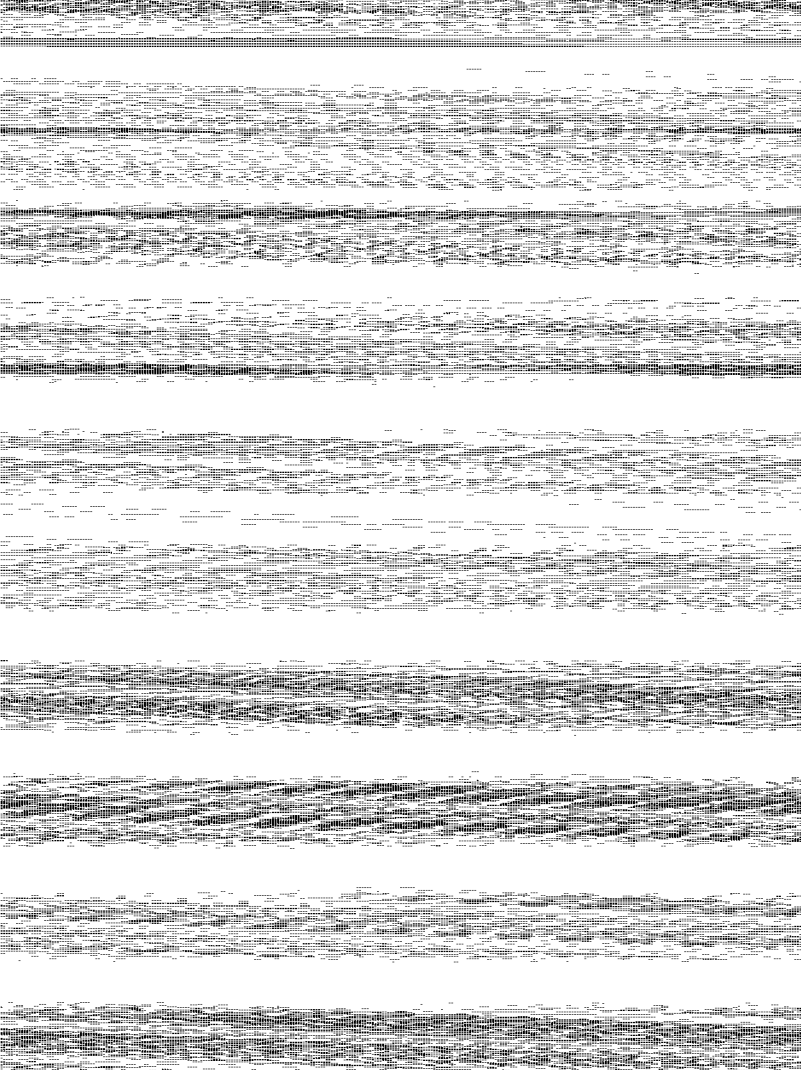
除酶促反应动力学研究中酶活力测定采用紫外分光光度法^[3]外,其余各步骤中均采用传统的常量碘法^[3]。动力学反应中,底物青霉素 G(Pc)和氨苄青霉素三水物(Ap)的浓度均为 0.1~0.5 mmol/L,测定波长分别为 232 nm 和 235 nm。

酶活力单位定义^[5]:37℃,0.1 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液中,每分钟水解 1 μmol 的底物所需的酶量。

1.3 *S. aureus* 胞外青霉素酶的分离纯化

除 90012 因产量和收率较低,在经过 CP 吸附洗脱后不再进行下面的纯化步骤外,其余各株的胞外酶经 CP 吸附洗脱、CMC 层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤,纯度分别由超薄层聚丙烯酰胺凝胶平板电泳(PAGE)、SDS-PAGE 和分析型等电聚焦(IEF)图谱上的蛋





进行了较为全面的研究,并与国外报道进行了对照。各酶主要表现青霉素酶的活性,分子量为 30000, pI 9.4。鉴于已有人证明粗酶提取液、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 90012 的部分纯化酶和其余各纯酶进行酶动力学测定,以避免 90012 纯化过程中酶活性丢失太大造成的影响。

根据酶对底物的相对水解活性(底物谱), 82052、82062、85053 可归为 I 类酶, 82143、90002 可归为 II 类酶, 90012、S-75 可归为 III 类酶。其中, I 类酶对邻氯、氧哌嗪、氨苄青霉素的相对水解活性高于 II 类酶,但低于 III 类;对苯唑青霉素和环己烯胺头孢菌素的相对水解活性最低;对头孢氨噻肟的相对水解活性高于 II 类酶而低于 III 类酶。II 类酶对头孢氨噻肟及环己烯胺头孢菌素的相对水解活性最高,而 III 类酶对其余七种底物的相对水解活性最高。

综合动力学常数测定结果,上述 I 类酶(82052、82062、85053)类似于 Richmond A 型酶, II 类酶(82143、90002)类似 Richmond D 型酶, III 类酶中的 S-75 类似 C 型酶,而 90012 类似 B 型酶。A、B、C 型酶对 Pc 的亲合力和水解活性都比较大,而 D 型酶对 Pc 的亲合力和水解活性比其它小 3~5 倍,对 Ap 的水解活性也比其它酶都要小, A 型酶对 Ap 的亲合力比其它酶低 1 倍而水解活性比 B、C 稍低。从动力学特征看来, A、D 型酶的区别

比较明显,分类也比较明确,而 B、C 两型酶不易区分。Zygmunt B 型酶与 C 型相似^[3]而与 Richmond B 型报道^[1]有别,他认为这是测定方法的不同造成的误差,前者用紫外分光光度法,后者用常量碘法,本文实验条件类似 Zygmunt,所得结果也与其类似。

实际上, Richmond A-D 型酶间的关联非常密切,它们的酶结构基因高度同源,氨基酸序列仅在第 121、226、229 位有细微的差别,而第 70 位的丝氨酸(Ser)活性中心高度保守。实验证明,这些氨基酸残基本身的差别不足以引起免疫学及动力学特征的变化,但可能引起蛋白质折叠形状的改变和高级结构的不同,从而影响酶的活动^[8]。

参考文献

- 1 Richmond MH. Wild type variants of exopenicillinase from *S. aureus*. *Biochem J*, 1965, **94**:584
- 2 Rosdahl VT. Naturally occurring constitutive Beta-lactamase with novel serotype in *S. aureus*. *J Gen Microbiol*, 1973, **77**:229
- 3 Zygmunt DT, Stratton CW. Characterization of four Beta-lactamases produced by *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, **36**:440
- 4 Coles NW, Gross R. Liberation of surface-located penicillinase from *S. aureus*. *Biochem J*, 1967, **102**:742
- 5 Perrin CJ. Iodimetric assay of penicillinase. *Nature*, 1954, **174**:1012
- 6 凌宝东,王裕东,刘定勇. 超薄层析性电聚焦技术在 β -内酰胺酶检测中的应用. *中国抗生素杂志*, 1990, **15**:184
- 7 张龙翔,沙庭芳,李令媛主编. 生化实验方法与技术. 北京:高等教育出版社,1987. 114
- 8 Haller I. Importance of extracellular and cell-bound Beta-lactamase in mediating resistance of *Staphylococcus aureus* to mezlocillin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984, **25**:125

Properties and Type Determinations of Exopenicillinases from *Staphylococcus aureus*

Sheng Qin, Chen Zhiben, Chen Xiaoying

Center of Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract Seven strains of *S. aureus* from clinical specimens were selected for exopenicillinases investigations. Molecular weight and isoelectric point were 30 000 and 9.4 for each purified exopenicillinase extract. Based on their properties, substrate profiles and kinetic constants, the seven enzymes were divided into four groups, Group I - IV, consistent to the previously-reported Richmond Type A-D.

Key words *Staphylococcus aureus*; Exopenicillinase; Kinetics of enzymatic reaction; Type determination