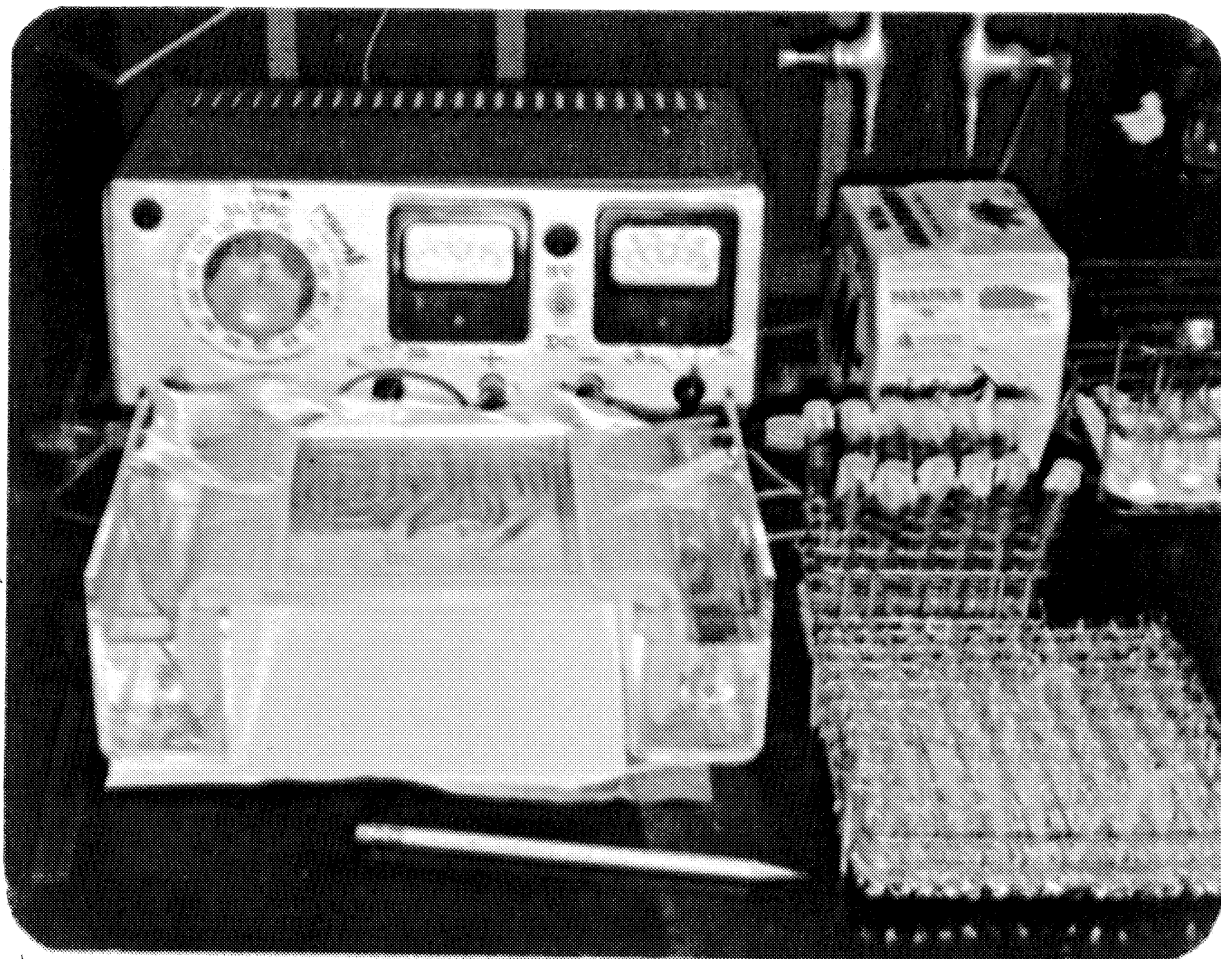


# 溶菌酶大量存在於蛋白內的生理意義

## 高中教師組生物第一名

台北市立第一女子高級中學

作者：林英子



### 一、緒言：

去年進行的原生質體的研究（參加第十八屆全國科展），顯示某些細菌對溶菌酶特別敏感，水稻白葉枯病病原菌是一種桿菌，極易受到溶菌酶的作用變成圓形的原生質體，故為測定溶菌酶活性的很好菌株。

溶菌酶存在於多種生物體內，但以蛋白質內的含量最高，約佔雞蛋蛋白內總蛋白質的 3.4%，一種酵素大量堆積在同一器官內，顯示該酵素扮演著一重要的生理作用，為了解溶菌酶大量存在於蛋白內的生理意義，乃利用去年的原生質體研究結果，並

配合生化分析等方法加以探討。

## 二、實驗材料及方法：

### (一)材料的製備：

由士林養雞場買回的種蛋（經過受精）及由批發商買回的未受精蛋，當為研究材料。

把雞蛋分成種蛋及未受精的蛋二組，同時放入孵蛋器（華氏100度）內孵化，每隔三天或四天取樣一次，再做生物分析或化學分析。

### (二)平板膠體電泳法：

#### 1 平板膠體（slab gel）的製備：

(A)膠體緩衝液（PH 8.9）：Tris base 18.2 克，HCl（1 N）24 毫升，SDS 0.4 克加水至 100 毫升。

(B)膠體溶液（30%）：Acrylamide 30 克，Bisacrylamide 0.8 克加水至 100 毫升。

(C)Ammonium persulfate 溶液：取 0.2 克加水至 100 毫升。

(D)電泳膠體的製備：上述溶液依 A : B : C = 1 : 1 : 2（V / V / V）比例配製，其方法為 A 與 B 混合抽氣後加入 TEMED 0.12%，C 單獨抽氣，再把 A、B、C 混合，再倒入平板槽內約半小時後就可取出備用。

2 電泳緩衝液（PH 8.3）：Tris base 6.06 克，glycine 28.8 克，SDS 2 克加水至 1000 毫升，使用時再稀釋一倍。

#### 3 蛋白質的製備。

樣品緩衝液，包含 2% SDS（W / V）10% glycerol（W / V）5% Mercaptoethanol 0.001% bromophenol blue 取一倍體積的樣品緩衝液，加一倍體積的蛋白，然後在沸水內煮沸四分鐘備用。

#### 4 放入蛋白質及開電源：

將做好的平板膠體放入電泳裝置上，在左右電泳槽內放入電

泳緩衝液，通電，再將處理過的蛋白質樣品加入小樣品槽內（20 $\mu$ l），電泳時所使用的電流為60mA，電壓為150V，通電約六小時，指示色帶移動約15公分。

5. 染色和褪色：

(A)固定：把平板膠體取出先用20% Sulfosalicylic acid 固定18~24小時。

(B)染色：配製0.02% Coomassie brilliant blue R 250 的水溶液，使用時用12.5%三氯乙酸稀釋20倍染色，染4~6小時。

(C)褪色：用10%三氯乙酸褪色，直到蛋白色帶（band）清晰為止。

6. 照像：平板膠體放在X-ray光板上照相。

(三)生物分析：

1. 比色法：不同孵化期取出的蛋，加三倍的水混合後，用小型桌上離心機3000 rpm離心十分鐘以除去Ovamucin，取上清液，用0.5M phosphate buffer PH 6.7 透析16小時，經稀釋後，再加EDTA（使其最後濃度約為0.00685M），加入菌液，細菌的量以光電比色計測定，在波長450 nm不超過1.0為宜，每隔一分鐘測其在450 波長吸光度降低的情形，作為蛋白內溶菌酶含量的測定。如用目測則菌須加至 $4 \times 10^9$  為宜。

2. 顯微鏡觀察：把蛋殼用針挑破一小洞，再由此洞把細菌注入，約隔5分鐘取出，觀察比較原生質體生成的情形。

(四)菌落的測定：

取出不同孵化期的蛋，作一系列稀釋，取定量（0.1ml）加入含有培養基的培養皿上，四天後再計數細菌的菌落。

(五)溶菌酶的抽取及純化：

100毫升的蛋白加入10% bentonite（in 1% KCl）溶液15毫升，迅速的攪拌，但須避免起氣泡，再用冷凍離心機（Sorvall）離心10分鐘（5000 rpm）除去上清液，沈澱物

再用 0.5M phosphate buffer ( PH7.5 ) 洗去其他蛋白成分，同上法離心 10 分鐘，再用 30 毫升 5 % Pyridine ( PH 7 ~ 8 ) 水溶液去洗 bentonite ，連續洗三次，再用 5 % Pyridine — Sulfuric acid ( PH5 ) 洗出溶菌酶，用自來水流動透析 24 小時以除去 Pyridine ，再用 2.6 M 硫酸銨沈澱濃縮，最後用蒸餾水透析。

### 三、結果與討論：

去年關於原心質體研究的結果（見參考文獻 5）顯示水稻白葉枯病病原菌很適合于分析溶菌酶的活性，圖一為該菌的顯微照片，圖二為該菌的原生質體，圖三係利用電子顯微鏡比較細菌及其原生質體的外形。

#### (一) 平板膠體分析溶菌酶的含量：

蛋白內含有大量的溶菌酶，用平板膠體分析可看到溶菌酶的色帶（圖四）因加的蛋白量太少，所以溶菌酶的色帶不很明顯，若用較多量蛋白則可得明顯色帶（圖五），平板膠體分析蛋白質效果很好，分子量相同的蛋白質會並排在一條線上，可以由蛋白質跑的距離來求出其分子量。

不同品種蛋白內，其所含蛋白質種類及含量不同（圖六），如鴨蛋的溶菌酶含量要比肉雞及土雞蛋為少。由（圖七）知受精的蛋及種蛋（受精蛋）其溶菌酶的含量似乎隨孵化時間而降低。由圖七也可看出用 bentonite 抽取的溶菌酶。

#### (二) 菌落的分析：

取出不同孵化期的蛋，做菌落的分析，發現一直到孵化三週的蛋都無菌落形成，如聞其味已發臭，由此可知蛋的發臭可能是自己解體（Autolysis）所造成，而非由於細菌所引起，因為把菌注射到蛋白內隔五分鐘，取出置於顯微鏡下觀察，發現菌受蛋白內溶菌酶的作用已成原生質體。

#### (三) 溶菌酶濃度的測定：

1 溶菌目測法：不同孵化期的蛋白稀釋液各取 3 ml + 0.3 ml 菌 + 100mME D T A 0.24ml ，用目測有無溶菌現象，以求其 end point ，見表一，因如蛋白內溶菌酶含量多，則在

短時間內就產生溶菌，由圖八試管可以分辨其透明度。

2 光電比色法：照上法取 3 ml 蛋白稀釋液 + 0.03 ml 菌 + 100 mME DTA 0.24ml，此時菌的 450nm 的吸光度約為 0.5 左右，再加入 100λ 的蛋白（稀釋濃度為 60 倍），搖勻每隔一分鐘測定一次，由圖九得知受精與未受精的蛋其溶菌酶的含量與圖七相符，其活性隨著孵化時間的延長而降低，且受精的蛋（種蛋）孵化至第 19 天似乎已無溶菌酶的活性。

(四) 孵化各期蛋的外形：由圖十及十一可以知道，受精的蛋與未受精的蛋，第一天其蛋黃因表面張力很大而呈球形，此時蛋白極易與蛋黃分開，孵化四天的種蛋，其蛋黃表面張力較小而呈扁圓形，孵化七天的種蛋可看到雞胚已發育了，且蛋白與蛋黃已混在一起，故此時取樣須很小心，至第 10 天，種蛋胚的發育更成熟，此時未受精的蛋其蛋白與蛋黃也混在一起，而且黏度降低了，此並非細菌作用的結果，因作菌落的分析，仍未找到有細菌存在，所以可能是自己解體，致使黏度降低，孵化至第 19 天，未受精的蛋皆已腐臭，至於種蛋，小雞幾乎已發育成熟了。

#### 四、結論：

- 1 蛋白內的成分以白蛋白含量最多，約佔 50%，溶菌酶約佔蛋白含量的 3%，且溶菌酶的分子量相當小，所以跑在最前端，根據文獻，知其分子量為 14,000。
- 2 不同種的蛋，其蛋白組成份的含量也不一樣，鴨蛋溶菌酶含量比雞蛋少。
- 3 蛋白內的溶菌酶可能與抗菌作用有關，實驗結果顯示外加細菌，很快即被作用形成原生質體，進而發生溶菌現象。
- 4 完整的蛋殼及蛋膜似乎不易被細菌侵入，故蛋白內溶菌酶大量存在的生理意義可能在于蛋形成過程中，用來預防細菌的感染。
- 5 孵化後期的蛋其蛋白內溶菌酶的含量降低，故雞胚可能需要另

一套抵抗外來細菌感染的系統。

6. 孵化三週的蛋，仍保持無菌狀態，此可能與溶菌酶的存在有關，又腐化的蛋也無細菌，故蛋腐化可能是自己解體所造成。
7. 蛋白內因含大量溶菌酶，故由蛋白內做溶菌酶的抽取，是一種既經濟又方便的方法。
8. 孵蛋時，尖頭要朝下，鈍頭朝上，蛋才能孵出小雞，正常一個蛋須孵化21天，才能發育成小雞。