

大肠杆菌碱性磷酸单酯酶的纯化

刘金富 王妙珠 申庆祥 匡达人

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

大肠杆菌碱性磷酸单酯酶是最常用的工具酶之一。它位于细胞的原生质膜与细胞壁之间。用渗透休克法把它从细胞释放出来，其纯度即可达到 40% 左右。但是在纯化过程中，不易除去杂酶，如 RNase。我们用 Torriani 法<sup>[1]</sup>从大肠杆菌 K<sub>12</sub> 筛选了单酯酶产量较高的突变株 Kc<sub>2</sub>，并观察了 Kc<sub>2</sub> 的生长时相与单酯酶的合成关系(图 1)。图 1 表明 K<sub>12</sub> 和 Kc<sub>2</sub> 合成酶的最高量虽然相似，但它们大量合成酶的起迄时间不同。

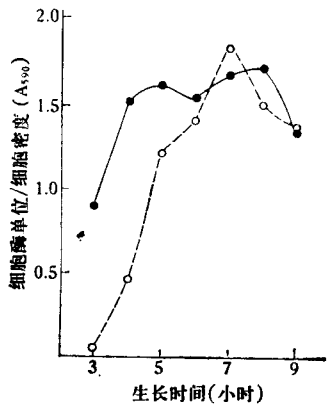


图 1 E. coli K<sub>12</sub> 与 Kc<sub>2</sub> 的生长时相与单酯酶合成的关系

培养基: 葡萄糖 0.4%; NH<sub>4</sub>Cl 0.02 M; KCl 0.02 M; NaCl 0.08 M; MgCl<sub>2</sub> 0.001 M; CaCl<sub>2</sub> 2 × 10<sup>-4</sup> M; ZnSO<sub>4</sub> 4 × 10<sup>-5</sup> M; FeCl<sub>3</sub> 2 × 10<sup>-6</sup> M; 肌苷 5 × 10<sup>-4</sup> M; Tris 0.12 M, pH 7.8, 水解乳清白蛋白 0.2%, 蛋白胨 0.1% (总无机磷量 6.4 微克/毫升)。生长温度 33—35°C ●——●: Kc<sub>2</sub>, ○——○: K<sub>12</sub>

整体细胞酶活力的测定方法: 4 毫升培养物离心 5 分钟(3000 转/分), 弃去上清液, 加 0.01 M Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液至 4 毫升, 使菌体悬浮, 取悬液 0.2 毫升加到 3.6 毫升含 3.7 × 10<sup>-3</sup> M 对硝基酚磷酸酯的 0.01 M Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液中, 置 37°C 温育 15 分钟, 然后加入 0.2 毫升 2 M NaOH, 测 A<sub>440nm</sub> 值。整体细胞酶活力单位是在上述条件下 A<sub>440nm</sub> = 1 时所需细胞量即为 1 个酶单位

K<sub>12</sub> 在生长第 6 到第 7 小时之间, 而 Kc<sub>2</sub> 则在生长第 4 到第 8 小时之间, 高酶活持续时间长, 这一优点放宽了收集菌体的时限。随后, 我们参照 Torriani 纯化单酯酶的方法<sup>[2]</sup>, 省去 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀一步, 在粗酶液自 Kc<sub>2</sub> 细胞抽出后, 经热处理和 DEAE-纤维素柱层析, 得到了 RNase 较少的酶制品(表 1)。本制品在 1 M NaCl 中于 4°C 保存四年, 不见明显失活。在用 RNA 连接酶连接 5'-末端以 <sup>32</sup>P 标记的寡核苷酸片段后的抗单酯酶试验中<sup>[3,4]</sup>和在用 DNA 连接酶连接 5'-端 <sup>32</sup>P 标记的 DNA 片段后的抗单酯酶试验

表 1 单酯酶的纯化过程

| 步 聚                | 总 活<br>( <sup>32</sup> 酶单位) | 比 活<br>(酶单位/<br>A <sub>278</sub> ) | **RNase/<br>AKPase % | 回收  |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------------|-----|
| 抽 出 物              | 299,000                     | 655                                |                      | 100 |
| 热 处 理              | 330,000                     | 1,208                              |                      | 110 |
| DEAE 纤维素<br>柱层析液缩后 | 97,760                      | 4,000                              | 0.2                  | 33  |

\* 测活方法: 2 毫升含 6.6 × 10<sup>-3</sup> M 对硝基酚磷酸酯的 0.6 M Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液和酶液 (总体积 2.4 毫升) 置 37°C 温育 15 分钟, 加 0.6 毫升 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH (pH 8.2), 最后体积 3 毫升, 磷的最终浓度为 0.1 M, 测 A<sub>410nm</sub> 值。酶的活力单位是在上述测活条件下 A<sub>410nm</sub> = 1 时所需的酶量即为一个酶单位。

\*\* 1 毫升含 0.5% 酵母 tRNA 的 0.6 M Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液和酶液 (总体积 1.5 毫升), 置 37°C 温育 15 分钟, 加 1.5 毫升 UPCA (0.25% 醋酸氧铈, 2.5% 过氯酸) 置冰浴内 10 分钟。然后离心 5 分钟, 取上清液 1.5 毫升, 加磷的显色剂 1.5 毫升, 置 45°C 水浴 20 分钟, 测 A<sub>520nm</sub> 值。RNase 占单酯酶百分数是在相同酶量条件下根据下式计算:

$$\frac{\text{RNase}}{\text{AKPase}} \times 100\% \\ = \frac{\text{从 tRNA 释放出来的总磷量} - \text{tRNA 原末端磷量}}{\text{从 5'-GMP 释放的磷量}} \times 100\%.$$

中<sup>[5]</sup>, 都得到较满意结果。最近我们重复了这一方法, 所得酶制品经酵母丙氨酸 tRNA 3'-端单加 <sup>32</sup>p Cp 后的长链 RNA 和 CpGpU<sup>32</sup>pCp 的检查, 未检测到 RNase 的存在。

## 参 考 文 献

[1] Torriani, A. et al.: *J. Bacteriol.*, **81**(5), 835, 1961.

- [2] Torriani, A. *Methods in Enzymology* Vol. XII, Part B 212, 1968.
- [3] 人工合成核酸组: 《中国科学》1978 年, 第 6 期, 第 679 页。
- [4] 中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组: 《微生物学报》1978 年第 18 卷第 3 期第 210 页。
- [5] 中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组 (上海) 中国科学院生物物理研究所二室核酸研究组 (北京)《微生物学报》, 1978 年第 18 卷第 3 期第 202 页。

[本文于 1981 年 5 月 27 日收到]

# 辅酶 I、辅酶 II 和辅酶 A 的各别分离

季 钟 煜\*

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

酵母和哺乳动物的肝脏分别为制备辅酶 I、辅酶 A<sup>[1,2]</sup> 和辅酶 II<sup>[3]</sup> 的好材料, 而且, 若将辅酶 I 制剂经过专一的转磷酸反应, 则可以制备辅酶 II<sup>[4]</sup>。但这些制法都存在一个如何将三个辅酶从彼此互存的生物组织中分别分离成为单组份的问题。早在 1954 年, 王德宝等<sup>[4]</sup>以甲酸型强碱性阴离子交换树脂为吸附剂, 利用同一种浓度的甲酸缓冲液, 可把辅酶 I 与辅酶 II 分离开。后来 Pastore 等<sup>[5]</sup>用二乙氨基乙纤维素 (DEAE-Cellulose) 为分离材料, 以 NaCl 溶液进行浓度梯度洗脱, 也能分离它们。根据我厂工作<sup>[2]</sup>, 可用 717 甲酸型树脂优先吸附酵母抽提液中的辅酶 A, 将辅酶 A 与辅酶 I 分开, 但在这一过程里, 同时也吸附了一些抽提液中的辅酶 I, 因此分离不完善。1978 年南京大学生物系等<sup>[6]</sup>用 717 氯型树脂吸附辅酶 A 发酵液中的辅酶 A, 再用 0.01 N HCl-0.02 N NaCl 溶液洗去吸附在树脂上的杂质, 最后用 0.01 N HCl-0.5 N NaCl 溶液将辅酶 A 从树脂上解吸下来, 但此树脂很难使辅酶 A 与 ATP 以及辅酶 A 前体物质分离开。从 Mitz 的报道中<sup>[7]</sup>可知, 一个含有辅酶 I, 辅酶 II 和辅酶 A 的混合溶液, 流过甲酸型强碱性阴离子交换树脂柱时, 三个辅酶都同时吸附于树脂上, 辅酶 I 能被 pH 6 甲酸缓冲液单独解吸下来, 辅酶 II 被 pH 3 甲酸缓

冲液洗脱下来, 最后用 pH 2 甲酸缓冲液可洗出辅酶 A。但报道的条件不明确。

我基于前人工作, 通过浓度梯度的探索试验, 建立这一各别分离方法。

## 材 料 和 方 法

**辅酶 I、辅酶 II 和辅酶 A** 均系东风生化试剂厂产品。其中辅酶 I 和辅酶 II 的纯度为 60—80%。每毫克辅酶 A 粗制品含 70 Lipmann 单位。

**各辅酶的测定法** 辅酶 I 用醇脱氢酶法测定<sup>[8]</sup>。辅酶 II 用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶法测定<sup>[9]</sup>。辅酶 A 则用 Kaplan-Lipmann 法测定<sup>[10]</sup>。

### 强碱性阴离子交换剂处理法

717 树脂处理成氯型, De Acidit FF 树脂处理成甲酸型。处理方法见文献 [1]。以上二树脂颗粒均为 80—160 目。

**0.1 M 甲酸盐溶液之配制** 0.1 M 甲酸溶液与 0.1 M 甲酸钠溶液以等体积混合。

**0.5 M 甲酸盐溶液之配制** 0.1 M 甲酸溶液与 0.9 M 甲酸钠溶液以等体积混合。

### 辅酶 A 与辅酶 I、辅酶 II 的分离

**吸附** 800 毫克辅酶混合物, (内含 210 毫

\* 现在在中国科学院上海生物化学研究所工作。