

- Res, 1988; 48: 5738
- 4 Verlaan-de Vries M, Bogaard M E, van den Elst H *et al. Gene*, 1986; 50: 313
- 5 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J, *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 123—124
- 6 McGrath J P, Capon D J, Smith D H *et al. Nature*, 1983; 304(11): 501
- 7 Burmer G C, Rabinovitch P S, Loeb L A, *Cancer Res*, 1989; 49: 2141
- 8 Stowers S J, Glover P L, Reynolds S H *et al. Cancer Res*, 1987; 47: 3212
- 9 俞孝庭著. 肿瘤病理学基础. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 121—124
- 10 Farr C J, Saiki R K, Erlich H A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 1629

## MUTATION OF Ki-ras ONCOGENE IN HUMAN LUNG CANCER DETECTED BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND OLIGONUCLEOTIDE HYBRIDIZATION

Qin Yang Sun Zhilin Zhao Jiansheng Sun Ning  
(Dept. of Biochemistry, West China University of Medical Sciences)

Bu Hong Liu Kaifeng  
(Dept. of Pathology, West China University of Medical Sciences)

### ABSTRACT

The frequency of oncogene Ki-ras12 (Val), Ki-ras13 (Cys) mutation was studied in paraffin embedded sections obtained from 50 human lung cancer by *in vitro* amplification of target sequences via polymerase chain reaction (PCR) and selective oligonucleotide hybridization. 13 samples (26%) contained Ki-ras mutation. 3 carcinomas exhibited 2 distinct Ki-ras mutation. The Ki-ras mutation was present in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, adenosquamous carcinoma, well differentiated, moderately differentiated, poorly differentiated human lung cancers.

**Key words** Human lung cancer, Ki-ras mutation, PCR

## 不吸水链霉菌葡萄糖异构酶的物化表征\*

李小平 黄友梅

张峰 苏普

(中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000)

(中国农业科学院兰州中兽医研究所, 兰州 730050)

### 提 要

葡萄糖异构酶是一种催化葡萄糖异构为果糖的酶。本文用紫外吸收光谱、红外光谱、氨基酸组分分析、聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、超薄

层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳技术研究了不吸水链霉菌嗜热亚种 M1033 菌株产生的葡萄糖异构酶的一些物化性质。结果表明由本实验室制备的均一葡萄糖异构酶的  $A_{280}$  与  $A_{260}$  的比值是 1.76。它是由一个亚单位组成的酶分子。最小分子量是 49000,  $pI$  值是 5.2。氨基酸组分与其它来源的葡萄糖异构酶的氨基酸组分相比较有一些差异,其中 Glu, Gly, Ala 和 Leu 的含量都比其它异构酶的高,而 Met, Trp, Asp, Thr 则比其它葡萄糖异构酶的低。

**关键词** 不吸水链霉菌嗜热亚种 M1033, 葡萄糖异构酶, 物化表征, 葡萄糖

不吸水链霉菌嗜热亚种 M1033 是目前我国筛选出的产胞外葡萄糖异构酶性能最优良的菌株, 但对于产自该菌株的葡萄糖异构酶其物化性质尚缺乏较系统的研究。

我们曾报道过一系列有关不吸水链霉菌葡萄糖异构酶催化葡萄糖异构为果糖的研究。其酶活力较高, 热稳定性较好<sup>[1,2]</sup>。为了进一步探讨其催化性能, 本工作用紫外吸收光谱、红外光谱、氨基酸组分分析、聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、超薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳技术对 M1033 菌株产生的葡萄糖异构酶的物化性质进行了表征。

## 1 实验部分

### 1.1 菌种

不吸水链霉菌嗜热亚种 (*Streptomyces ahyscopicus* subsp. *thermophilus* Yan Zhang et al<sup>[1]</sup>) 变异株 M1033 作为菌种。培养液成分按印明善等人使用的配方<sup>[2]</sup>。配制好的培养液每份取 50ml 分装在 500ml 三角瓶中置恒温摇床上进行培养。振次: 150—200 次/min。培养温度: 41℃。培养时间: 55—60h。

### 1.2 酶的分离和纯化

培养好的发酵液(活力单位: 260U/ml) 用尼龙布过滤。滤液在 40—45℃ 的水浴中进行减压浓缩至原有体积的 1/2 后离心弃去沉淀物。清液分别用 30%、60% 饱和度的硫酸铵和冰冻丙酮进行分级处理, 活性部分经 Sephadex G150 和 DEAE-Sephadex A50 柱层析分离, 可获得电泳纯的均一酶液。经冷冻干燥制得的白色干粉 (298U/mg) 作为本研究工作的实验材料。

### 1.3 酶活力测定

按印明善等人使用的方法<sup>[3]</sup>。

### 1.4 蛋白质含量测定

采用紫外吸收法。用牛血清白蛋白做标准, 在 280nm 处测定。

### 1.5 紫外吸收光谱

由 Sephadex-A50 得到的均一酶液经透析袋透析后, 在日本岛津 UV-365 紫外吸收光谱仪上进行 240nm—700nm 的扫描。

### 1.6 红外光谱

冷冻干燥制得的白色干粉异构酶样品与氯化钾彻底混合后压片制成一个圆盘, 在美国尼克莱特 (Nicolat) 10DX 富里叶变换红外光谱仪上进行 4600—400 $\text{cm}^{-1}$  范围内扫描。分辨率为 4 $\text{cm}^{-1}$ 、误差为  $\pm 2\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.7 氨基酸组分分析

以 6mol/L HCl 水解, 用日立 835-50 型氨基酸组分分析仪测定, 并以原样做为基础计算, 色氨酸用同一仪器测定。

### 1.8 聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳

按 LKB 实验指南介绍的方法, 梯度胶的浓度为 4—30%, 胶规格: 9cm×9.5cm×0.2cm。样品胶高 1.5cm、分离胶高 8cm。电泳缓冲液: 0.09mol/L Tris, 0.08mol/L 硼酸, 0.0025mol/L EDTA, pH 8.4。在 70V 预电泳 30min, 然后于 500V 电泳 2.5h。循环水温度 10℃。

### 1.9 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按照 LKB 实验指南介绍的配方进行配胶。胶浓度为 10%。选用圆盘电泳仪测定。缓冲液为 0.25mol/L Tris、2mol/L 甘氨酸、1% SDS (pH 8.3)。用时按 1:10 与无离子水混合。用 6 个电泳凝胶管进行实验, 初始电流为 2.5

mA/管, 15min后升至3.5mA/管。电泳时间3.5h。

### 1.10 超薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳

按照 LKB 实验指南介绍的方法, 采用 LKB 公司 0.2mm 毛细管灌胶模具 (125mm × 240mm × 0.2mm) 制备凝胶膜。上限电压 2000 V, 预电泳 20min, 电泳 60min。循环水温度 6°C。

## 2 结果和讨论

### 2.1 葡萄糖异构酶的紫外吸收光谱和红外光谱

图 1 是葡萄糖异构酶的紫外吸收光谱, 从图 1 可以看到有两个吸收峰值, 第一个吸收峰在 260nm 处, 第二个吸收峰在 280nm 处。A<sub>280</sub> 与 A<sub>260</sub> 的比值是 1.76。

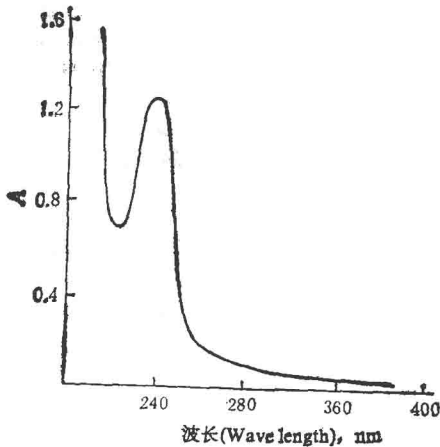


图 1 纯化的不吸水链霉菌葡萄糖异构酶紫外吸收光谱  
Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of purified glucose isomerase from *Streptomyces ahyscopicus*

图 2 是天然固态葡萄糖异构酶的红外光谱。在 3300, 3180, 1660, 1570, 1300, 730, 630, 600cm<sup>-1</sup> 处均有较强的吸收峰, 属于 N—H, C=O, C—N 的伸缩振动以及 N—H, O=C—N, C=O 的弯曲振动。表明天然固态葡萄糖异构酶分子表面存在 N—H, C=O, C—N 和 C=C—N 基团。

### 2.2 葡萄糖异构酶的氨基酸组成

不吸水链霉菌 (*Streptomyces ahyscoco-*

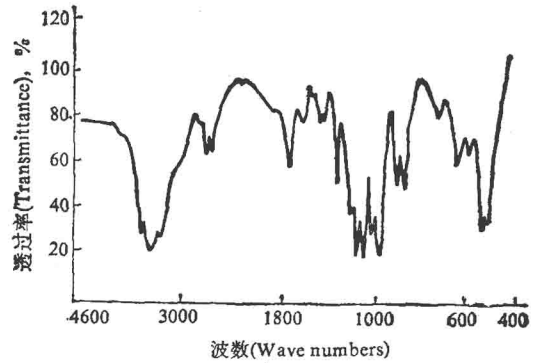


图 2 天然固态不吸水链霉菌葡萄糖异构酶的红外光谱  
Fig. 2 Infrared spectrum patterns of native solid glucose isomerase from *Streptomyces ahyscopicus*

*picus*.) 葡萄糖异构酶(A)的氨基酸残基含量见表 1。表 1 还列出了其它来源的葡萄糖异构酶的氨基酸残基含量。

从表 1 可以看出虽然都是异构酶能催化同一种反应, 但是它们的氨基酸组分却不同。在不吸水链霉菌葡萄糖异构酶分子中 Glu, Gly, Ala, Leu 的重量比均比其它三种葡萄糖异构酶的高, Met, Trp, Asp, Thr 的重量比均比其它三种异构酶的低。通过计算可知不吸水链霉菌葡萄糖异构酶的最小分子量是 49000。

### 2.3 葡萄糖异构酶的分子量

2.3.1 用聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳测定分子量<sup>[6]</sup>



图 3 标准蛋白质和葡萄糖异构酶的梯度凝胶电泳图谱  
Fig. 3 Gradient gel electrophoresis patterns of standard proteins and glucose isomerase

选用分子量分别为 94000, 67000, 30000, 20100, 14400 的标准蛋白质做标准, 与葡萄糖

表1 不吸水链霉菌葡萄糖异构酶与其它来源的葡萄糖异构酶的氨基酸组成比较

Table 1 Amino acid composition of glucose isomerase from *Streptomyces ahgrosopicus* compared with that from other sources

氨基酸 Amino acid	氨基酸残基/蛋白质 Amino acid residue/protein (g/100g)			
	A	B	C	D
Asp	8.12	9.90	9.10	13.10
Thr	3.03	4.00	4.40	5.05
Ser	1.81	1.80	2.80	3.85
Glu	12.72	9.80	11.40	11.10
Gly	6.24	4.10	3.60	3.80
Ala	9.84	6.90	4.80	5.68
Met	1.30	1.80	2.00	2.25
Ile	3.95	2.90	3.50	
Leu	11.28	8.50	8.20	9.55
Tyr	3.13	2.60	5.80	5.94
Phe	7.77	6.20	7.20	8.86
Lys	2.93	2.70	6.40	8.80
His	2.54	2.60	3.10	
Arg	7.14	9.70	5.30	5.92
Pro	4.83	3.80	2.10	2.66
Trp	0.90	2.20	2.30	1.55
NH <sub>2</sub>	2.29	0.95	1.52	1.25
Half-Cys	0.79			
Total	95.91	84.45	87.70	99.59

- A: 不吸水链霉菌葡萄糖异构酶  
Glucose isomerase from *Streptomyces ahgrosopicus*;
- B: 橄榄产色链霉菌葡萄糖异构酶  
Glucose isomerase from *Streptomyces olivochromogenes*<sup>[4]</sup>;
- C: 嗜热脂肪芽孢杆菌葡萄糖异构酶  
Glucose isomerase from *Bacillus stearothermophilus*<sup>[2]</sup>;
- D: 凝集芽孢杆菌葡萄糖异构酶  
Glucose isomerase from *Bacillus coagulans*.

异构酶的样品在相同条件下同时进行电泳, 电泳结果见图3。以标准分子量的蛋白质的相对迁移率与分子量对数作图测定葡萄糖异构酶的分子量(图4)。由此得到的葡萄糖异构酶的分子量是49000。

### 2.3.2 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量

用牛血清白蛋白(分子量67000)做标准蛋白质。异构酶样品作参照, 并将异构酶样品与

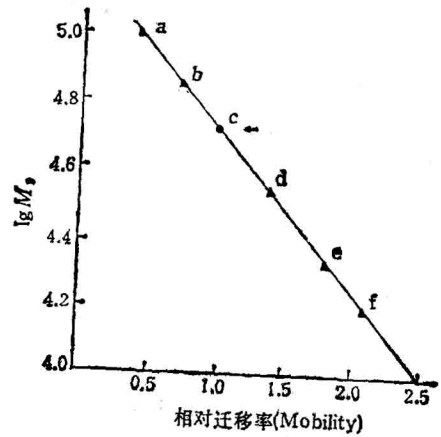


图4 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳测定葡萄糖异构酶的分子量  
Fig. 4 Determination of the molecular weight of glucose isomerase by polyacrylamide gel electrophoresis in a continuous molecular sieve gradient

- a. 磷酸化酶 b; b. 牛血清白蛋白; c. 葡萄糖异构酶; d. 碳酸酐酶; e. 大豆胰蛋白酶抑制剂; f.  $\alpha$  乳清蛋白
- a. Phosphorylase b; b. Bovine serum albumin; c. Glucose isomerase; d. Carbonic anhydrase; e. Soybean trypsin inhibitor; f.  $\alpha$ -Lactalbumin.

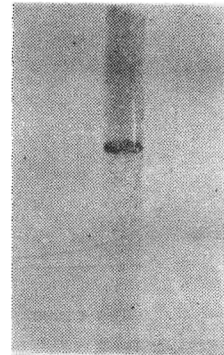


图5 葡萄糖异构酶 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱  
Fig. 5 Patterns of glucose isomerases by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

牛血清白蛋白混合后在相同条件下进行电泳。从图5可以看出不吸水链霉菌葡萄糖是一个亚单位。由此方法测得的葡萄糖异构酶的分子量是51000。

### 2.4 葡萄糖异构酶的等电点

用 LKB 公司 2% 1809 Ampholine (pH 3.5—9.5)作介质。聚丙烯酰胺凝胶浓度为2%。实验测得的葡萄糖异构酶的 pI 值是5.2。

印明善、马秀贞副研究员在发酵工作上给予很大支

持,在此表示感谢。

### 参 考 文 献

- 1 马秀贞,印明善,李小平. 微生物学杂志,1989;9(1): 10
- 2 李小平,马秀贞,温广梅等. 见: 全国化学学会等编,全国络合催化会议论文摘要集,兰州: 中国科学院兰州化学物理研究所,1987: 92

- 3 印明善,马秀贞,叶乃芝等. 生物工程学报,1986;2(1):52
- 4 Chem W P, Anderson A W. Appl Environ Microbiol, 1979; 38(6): 1111
- 5 Danno G. Agric Biol Chem, 1970; 34(12): 1795
- 6 Suekane M, Tamura M. Agric Biol Chem, 1978; 42(5): 909

## CHARACTERIZATION OF THE PURIFIED GLUCOSE ISOMERASES OF *STREPTOMYCES AHYGROSCOPICUS*

Li Xiaoping Huang Youmei

(Lanzhou Institute of Chemical Physics, Academia Sinica, Lanzhou 730000)

Zhang Feng Su Pu

(Biochemistry Lab of Institute of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences)

### ABSTRACT

Some enzymatic properties of the purified glucose isomerase of *Streptomyces ahgrosopicus* were examined by means of different methods, such as ultraviolet spectrum (UV), infrared spectrum (IR), amino acid composition analysis and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), 0.2mm thin-layer electrophoresis (TLE).

The *Streptomyces ahgrosopicus* glucose isomerase was found to consist of one subunit by SDS-PAGE. The molecular weight of the enzyme determined by polyacrylamide gel electrophoresis in a continuous molecular sieve gradient method was 49700. The pI of the enzyme determined by 0.2mm thin-layer electrophoresis method was 5.2. Large differences were found in the amino acid composition compared with the enzymes from other sources.

**Key Words** *Streptomyces ahgrosopicus* subsp. *thermophilus*, glucose isomerase, enzymatic properties, glucose

(上接第 272 页)

度将会对柱效的增长产生负的影响。

### 参 考 文 献

- 1 Wallingford R A, Ewing A G. *Advanced in Chromatogr* 1989; 29: 1—75.
- 2 Terabe S. *Anal Chem*, 1990; 62(10): 604
- 3 Giddings J C. *Sep Sci*, 1969; 4: 181
- 4 Knox J H, McCormack K A. *J Liquid Chromatography*, 1989; 12(13): 2435
- 5 Knox J H. *Chromatographia*, 1988; 26: 329
- 6 Grushka E, McCormack R M *et al. Anal Chem*, 1989; 61: 241

- 7 Bingcheng Lin, Xinhua Chu, Yungching Zhang, Do Xin. *Abstracts of 4th International Symposium on Capillary Electrophoresis*, Feb. 6—9, 1992
- 8 Hjerten S. *US Patent*, 4, 680, 201
- 9 Hjerten S. *US Patent*, 4, 725, 343
- 10 Terabe S, Otsuka K *et al. Anal Chem*, 1984; 56: 111
- 11 Terabe S *et al. J Chromatog*, 1989; 480: 403
- 12 Lux J A *et al. J High Resolut Chromatogr*, 1990; 13(2): 145
- 13 Zhu Minda, Roberto R *et al. Bio-Rad reports*
- 14 Cohen A S, Paulus A *et al. Chromatographia* 1987; 24: 15
- 15 林炳承,褚新华,张云清等. 分析化学, 1992; 印刷中