

康氏木霉 β -葡萄糖苷酶的结晶与电镜观察

汪大受 张静娟

(中国科学院微生物研究所,北京)

将已分离提纯的康氏木霉 β -葡萄糖苷酶用逐步降低浓度的硫酸铵溶液在 -2°C 抽提, 然后在 $4-7^{\circ}\text{C}$ 放置 11 天后在饱和度为 50%、45% 和 40% 的抽出液中均出现结晶。

利用戊二醛固定和草酸双氧铀负染技术在电子显微镜下观察了 β -葡萄糖苷酶结晶, 在放大 11 万倍左右时可看到晶体酶分子的有序排列。对 β -葡萄糖苷酶结晶进行选区电子衍射, 出现六角形的点阵图。点阵图的排列位置与结晶酶的电子显微镜照片一致。说明该酶的确形成结晶。平面晶格大小为 $56 \times 96 \text{ \AA}$ 。

对于 β -葡萄糖苷酶的研究过去报道较多。Barras 等^[1] 曾将 β -葡萄糖苷酶分为两大类: 一类为芳基 β -葡萄糖苷酶, 一类为其它 β -葡萄糖苷酶。这两类酶在配糖物特异性要求, 葡萄糖酸 δ -内酯的抑制作用以及释放出葡萄糖的构型等方面均不相同。Helferich^[2] 曾报道过来自杏仁当中芳基酶的结晶。而康氏木霉的 β -葡萄糖苷酶与杏仁的芳基 β -葡萄糖苷酶不同, 它是属于 Barras 分类中的第二类, 即对全糖苷 (hologlycoside) 和配糖苷 (heteroglycoside) 都能水解的 β -葡萄糖苷酶。对于这类酶的结晶尚未见报道。本文系报道该酶的结晶及电镜观察结果。

材料与方 法

(一) 酶制品: 进行结晶的酶为聚丙烯酰胺电泳均一的酶制品, 提纯方法见前报^[1]。

(二) 酶活测定: 用二硝基酚 β -葡萄糖苷为底物, 具体测定方法见前报^[1]。

(三) 蛋白质测定: 用 Lowry 法^[3], 纯度鉴定用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 方法见前报^[1]。

(四) 电子显微镜样品的制备

结晶样品: 在酶结晶连同少量母液中滴加

戊二醛使其达 0.5% 浓度左右, pH 6.0 室温放置 20 分钟后将固定的酶结晶连同母液滴于预先置有火棉胶-碳膜的铜网上, 过剩的溶液用滤纸吸去, 自然干燥 10 分钟左右, 然后将 0.5% 草酸双氧铀 (pH 6.44) 滴加在样品上进行负染, 1 分钟后将负染液用滤纸吸去, 再用同法负染 1 分钟, 后用滤纸将多余染液吸去, 真空干燥备用。作电子选区衍射的结晶样品则不经过负染和固定, 只用蒸馏水将结晶洗 3 次。

(五) 电子显微镜观察: 用 JEM-100B 型电子显微镜进行观察。

结 果

(一) 酶的结晶

按 Jacoby 的方法^[5] 先将酶液蛋白用 60% 饱和度硫酸铵沉淀。再在 -2°C 用逐步降低浓度的硫酸铵溶液抽提, 然后在 $4-7^{\circ}\text{C}$ 下放置, 利用酶蛋白在低温溶解度高, 逐步升高温度时溶解度降低这一性质使结晶析出。

预先配制饱和度为 50%、45%、40%、35%、30% 和 25% 的硫酸铵溶液 (用 pH 6.0, 0.02 M 磷酸缓冲液作溶剂), 放置在冰浴

本文于 1980 年 7 月 3 日收到。

中,然后在冰浴中依次抽提,每次抽提在冰浴中放5分钟,然后在 -2°C 离心5分钟(10,000g),立即将上清液倒入玻璃试管中置于 $4-7^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中,11天以后分别在50%,45%,40%浓度中观察到结晶出现(图版I-1)。

将结晶悬浮液在 4°C 离心,将上清母液倒入另一试管中。将结晶溶于与母液等体积的pH 6.0,0.02M磷酸缓冲液中。分别测定蛋白质含量及酶活力(见表1),并用凝胶电泳鉴定纯度(图版I-2)。

表1 结晶及母液的蛋白质含量及酶活力

Table 1 Protein content and enzyme activity in the crystals and mother liquor

样品 Sample	蛋白质 Protein ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	比活 Specific activity ($\text{A}_{400\text{nm}}/\text{mg}$)
45%饱和度硫酸铵 (NH_4) ₂ SO ₄ of 45% sat.	结晶 crystals	340
	母液 mother liquor	19
50%饱和度硫酸铵 (NH_4) ₂ SO ₄ of 50% sat.	结晶 crystals	1000
	母液 mother liquor	40

(二) 电子显微镜观察

经染色的 β -葡萄糖苷酶结晶在电子显微镜下可看到酶分子的有序排列(见图版I-3)。我们对酶结晶作了选区电子衍射,得到六角形倒易点阵图(见图版I-4)。点阵图与酶结晶电子显微镜图是吻合的,平面晶格大小为 $55 \times 93 \text{ \AA}$ 。晶格的计算参照Frey^[6]的方法。

讨 论

用Jacoby的方法得到的结晶多为微晶

($1-4 \mu\text{m}$)。有人报道^[7]放置温度降低至 7°C 左右,得到较大晶簇,而我们利用降低放置温度($4^{\circ}\text{C}-7^{\circ}\text{C}$)的方法得到较大的片状六角形结晶,结晶重叠起来,直径约为 $100 \mu\text{m}$ 左右。Helferich从杏仁当中得到的 β -葡萄糖苷酶成分B的结晶也是六角形片状结晶,但它的结晶重叠。由于我们所用的酶已经过提纯,所以在结晶过程中比活未见明显提高。

β -葡萄糖苷酶结晶在电子显微镜下可看到明显的酶分子的有序排列。我所以前曾报道过红曲葡萄糖淀粉酶结晶的电子显微镜观察结果^[8],分子排列成四方形,而 β -葡萄糖苷酶结晶的分子排列为六角形。分子排列与结晶选区电子衍射是一致的。它可说明该酶在此条件下,的确生成结晶。

参 考 文 献

- [1] Barras, D. R. et al.: Celluloses and Their Application Advances in Chemistry Series 95 (Ed. Gould, R. F.), American Chemical Society Publication, 1969, 105-138.
- [2] Helferich, V. B. and T. Kleinschmidt: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 348: 753-758, 1967.
- [3] 汪大受等: 生物化学与生物物理学报, 12(3): 293-300, 1980.
- [4] Lowry, O. H. et al.: J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- [5] Jacoby, W. B.: Methods in Enzymology, Vol. 22 (Ed. Jacoby, W. B.) Academic Press, 1971, 248-252.
- [6] Frey, T. G. et al.: J. Biol. Chem., 235: 4389-4395, 1978.
- [7] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 微生物学报, 16(3): 200-205, 1976.
- [8] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 生物化学与生物物理学报, 10(4): 349-354, 1978.

CRYSTALLIZATION AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES OF β -GLUCOSIDASE FROM *TRICHODERMA KONINGII*

Wang Dashou Zhang Jingjuan

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Crystallization of β -glucosidase from *Trichoderma Koningii* was achieved by extracting the purified enzyme protein with ammonium sulfate solutions of decreasing concentration at -2°C and allowing it to stand at $4-7^{\circ}\text{C}$ for 11 days. Crystals were formed in extracts of 50, 45 and 40% saturation.

The crystals were examined under the electron microscope after fixation with glutaraldehyde and negative staining with uranyl oxalate. At high mag-

nification ($\times 110,000$) the enzyme molecules were found to be arranged orderly. Selected area electron diffraction patterns of the crystals showed hexagonal spot patterns which were in accord with the electron micrographs of the crystalline enzyme. The spot patterns suggested that the β -glucosidase crystallized under the above neutral conditions was a true crystal. The dimensions of the unit crystal lattice was found to be about $56 \times 96\text{\AA}$.