

# 大肠杆菌 L-天冬酰胺酶蛋白分子和结晶的电子显微镜观察

郝凤兮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

继大肠杆菌 AS 1.357 L-天冬酰胺酶被提纯, 结晶之后<sup>[1,2]</sup>, 本实验室报道了 L-天冬酰胺酶分子有可逆的解离-聚合现象<sup>[3]</sup>。由于近年来蛋白质分子的电镜观察和制样技术日趋成熟<sup>[4-7]</sup>, 所以对酶分子的解离-聚合现象进行直接形态观察成为可能。Irion<sup>[8]</sup> 曾用电镜观察过各种聚合体的混合溶液。本工作在电镜观察前先用聚丙烯酰胺凝胶电泳将各种多聚体分离, 然后用电镜进行酶蛋白晶体的形态观察。

## 材料和方法

### (一) 材料

L-天冬酰胺酶由天津生化制药厂提供(比活力 160u/mg 蛋白)。L-天冬酰胺酶的单体、二聚体、三聚体样品用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离<sup>[3]</sup>, 然后用 0.02M pH3.0 柠檬酸缓冲液浸提制备。结晶 L-天冬酰胺酶按前报方法制备<sup>[2]</sup>。

### (二) 方法

#### 1. 电子显微镜样品制备

(1) 酶蛋白分子电子显微镜样品制备: 将浸提得到酶液稀释到一定浓度(约 10 $\mu$ g—100 $\mu$ g/ml), 用滴管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, 然后将 1% 磷钨酸(pH 6.5) 或 1% 醋酸双氧铀(pH4.4) 滴加在样品上进行负染, 一分钟后将负染液用滤纸吸去, 放干燥器干燥备用。

(2) 结晶电子显微镜样品制备: 将带少许母液的酶结晶移入 1% 戊二醛中, 置冰箱 24 天左右, 然后将固定的酶结晶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, 用水滴在样品上立即用滤纸吸去, 反复两次。自然干燥 5—10 分钟后, 将 1% 醋酸双氧铀(pH4.4) 滴在样品上进行负染, 一分钟后将负染液用滤纸吸去, 放干燥器干燥备用。

#### 2. 电子显微镜观察

用 H500 电子显微镜观察。观察酶蛋白分子

时, 加速电压 75KV, 电子放大 9 万倍。观察酶结晶时, 加速电压 100KV, 电子放大 4.8—8 万倍。

## 结 果

1. L-天冬酰胺酶的各聚合体的分子形态观察: 图版 1-1—4 为该酶各聚合体的电镜照片。从图版 1-1 可见多数呈游离单个粒子状(单体); 图版 1-2 多数呈两个粒子相连状(二聚体); 图版 1-3 多数呈三个粒子鼎立状(三聚体), 提高放大倍数(60 万倍) 还可见到各单个粒子由四个相同形态的亚基构成(图版 1-4)。

2. L-天冬酰胺酶结晶形态观察: 图版 1-5, 6 为负染的 L-天冬酰胺酶结晶的电镜照片。从图版 1-6 可见单个晶体外形整齐呈棒状。提高放大倍数(24 万倍) 可见晶体内酶分子的有序排列, 组成酶分子的亚基之间有小孔, 酶分子又呈等距离排列构成晶格(图版 1-5)。在照片上重复测量 10 个分子的直径和间距, 取平均值, 计算晶格大小约为 78 $\times$ 58 Å。

## 讨 论

1. 前文<sup>[2,3]</sup>报告 L-天冬酰胺酶分子通常呈不同聚合体形式存在(单体, 二聚体和三聚体, 分子量分别为 144500, 144500 $\times$ 2 和 144500 $\times$ 3 道尔顿), 在适当条件下这些多聚体可以互相转化。本工作用电镜直接观察到各聚合体的客观存在, 与前文报告的结论完全一致。鉴于它们之间可以互相转变, 所以在二聚体的照片中可见少许单体, 在三聚体的照片中可见少许单体和二聚体。

2. 前文<sup>[3]</sup>报告 L-天冬酰胺酶(144500 道尔顿) 由四个相同的亚基(3700 道尔顿) 组成。从亚基结构的电镜照片也可见到, 多数由四个近球形亚基组成, 少数只见三个近球形亚基, 这显然是由

本文于 1981 年 12 月 10 日收到。

本文经孟广震同志审阅。本所电镜组同志协助拍摄照片, 特此致谢。

拍照角度不同所致。

3. 本文首次报告了 L-天冬酰胺酶结晶的电镜观测结果, 这一结果不单为晶体的鉴定及晶体的形态分析提供了必要的资料, 而且还是研究晶格结构和计算分子量的重要依据。为求得正确的晶格大小, 首先用牛肝过氧化氢酶结晶校准电镜放大倍数, 理论值  $84 \text{ \AA}$  实测  $83.4 \text{ \AA}$ , 标准误差  $0.7\%$ , 因此可以相信, 晶格大小的计算数据是足够准确的。

### 参 考 文 献

- [1] 孟广震等: 微生物学报, **13**(2): 102—106, 1973.
- [2] 孟广震等: 微生物学报, **15**(3): 227—230, 1975.
- [3] 郝凤兮等: 微生物学通报, **24**(20): 940—942, 1979.
- [4] 龚祖坝: 生物化学与生物物理进展, 1976 年第 1 期, p47.
- [5] Haschemyer, R. H: *Annu. Rev. Biochem.*, **43**: 279, 1974.
- [6] Oliver, R. M. *Methods in Enzymology* (Hirs C. H. W and S. N Timasheff ed.) Vol. 27, Academic press, New York and London, 1973, pp616—672.
- [7] 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进展, **10**(4): 349—354, 1978.
- [8] Irion, E. and Voigt, W. H: *Hoppe-scyler's Z. physiol. chem.*, **351**: 1154—1156, 1970.