

固定化多核苷酸磷酸化酶的研究

III. 酶与多核苷酸复合物的形成

刘年娟 张渝英 杨开宇

(中国科学院微生物研究所, 北京)

固定化多核苷酸磷酸化酶(简称 PNP 酶)在催化聚合反应过程中与合成的多核苷酸相联, 形成酶-多核苷酸复合物。反应产物分析表明: 反应液中除了残留未经反应的底物以及大分子聚合物外, 未检查出中间寡聚物。以上结果提示, 固定化 PNP 酶催化聚合反应机制为连续反应。

在不外加二价金属离子条件下, 固定化 PNP 酶在 pH 8—9 与底物 ADP、CDP 或 IDP 长期保存, 具有明显可检测出的聚合反应, 且生成的多核苷酸也与酶相联。在同样条件下, 自然酶则不催化聚合反应。

固定化 PNP 酶能使用 680 次以上。这种罕见的操作稳定性除与固定化有关外, 底物、产物均有保护作用。pH 8—9, Mg^{2+} 也有有利的影响, 在所有的这些因子中, 固定化以及酶-多核苷酸复合物对于酶的稳定性尤有特殊贡献。

关键词 固定化; 多核苷酸磷酸化酶 (PNP 酶)

固定化酶有反复使用, 易于分离产物, 便于连续化生产等优点, 除了有实用价值外, 还可以作为理论研究的材料, 这是因为酶经过固定化后, 某些性质发生了改变, 通过比较研究对酶的催化特性及作用机制可以得到进一步的启示。

继对固定化 PNP 酶的制备与应用研究之后, 我们进一步探讨了此酶的某些催化特性, 证明了固定化酶能与其产物多核苷酸形成复合物, 讨论了聚合反应的作用机制, 并对其高度稳定性的原因作了分析。

材料与方 法

(一) 固定化 PNP 酶的制备

见前文^[1]

(二) 酶活力测定

反应系统: 0.12 M pH 9 Tris-HCl 缓冲液 1ml, 0.012 M MgCl₂ 1ml, 3M KCl 1ml, ADP 钠盐 (4.5 mg/ml) 2ml, H₂O 1ml。固定化酶适量 (通常用 2g)。37℃ 反应 30 分钟。抽滤, 取滤液

3ml, 加入 10% HClO₄ 1ml, 冰浴放置 10 分钟后, 3500 转/分离心 5—10 分钟。所得沉淀依次用 5% HClO₄, 无水乙醇洗涤, 每次 3ml。最终用 0.1 M pH 8 Tris-HCl 缓冲液溶解回复到原体积 (3ml), 离心除去不溶物, 稀释后于 257 nm 测定吸光度, A_{257 nm} 表示酶活力, 即 Poly A 聚合量^[2]。

固定化酶重复测定时, 必须先用水洗至洗液中无紫外吸收, 以除去载体吸附的底物及产物。通常 2g 固定化酶每次用 10 ml 水, 搅拌洗涤 3—4 次即可完全除去。

(三) 聚合物转化百分率计算

见前文^[1]。

(四) 无机磷测定

按 Chen 等方法^[3]。

结果与讨论

(一) 从两种测定酶活力方法的比较, 考察酶与多核苷酸的结合

1. PNP 酶催化 XDP (核苷二磷酸) 聚

本文于 1982 年 3 月 11 日收到。

合反应时,产生多核苷酸同时释放无机磷。因此,可以根据两种产物之一的生成量来确定酶活力的高低。为了直接测定聚合物的产量,我们用 ADP 为底物,检查 Poly A 的生成量。试验中发现,固定化酶首次测定的酶活力,均低于第二次、第三次(表 1)。

2. 在固定化酶进行第一次聚合反应时,从酶的反应动力学分析,前期 Poly A 的增长速率缓慢有停滞现象,后期明显加快。而第二次聚合反应时,无停滞现象(图 1a)。这两种情况,似乎反映了 PNP 酶对“引物”有一定的要求。即第一次或前期反应所生成的 Poly A 保留在固定化酶上,可以作为以后反应的“引物”,从而加速 Poly A 链的延长。如果确实由于“引物”的存在影响到聚合反应速度,则在同一反应的另一产物——Pi 的释放量,也应遵循这一规律。

表 1 固定化 PNP 酶首次与重复测定时 Poly A 聚合量的变化

Table 1 Amounts of Poly A synthesized in successive assays

实 验 Experiment	Poly A ($A_{257nm} \times 10^{-1}$)			
	1 1st.	2 2nd.	3 3rd.	4 4th.
1	0.42	0.95	1.17	1.37
2	0.47	0.99	1.28	1.37

为了探明这一点,在同一次聚合反应中,分别测定了 Poly A 和 Pi。图 1b 表明无论是第一次测定,或已经反应过的酶进行重复测定,固定化酶聚合反应时无机磷的释放量均与时间成直线正相关,无停滞期现象。第一次反应与第二次、第三、四次 Pi 的释放量也无显著区别(表 2)。

无机磷测定的结果说明,首次和重复测定过程中固定化酶催化聚合反应的速度是一致的。然而两种方法测定的结果不

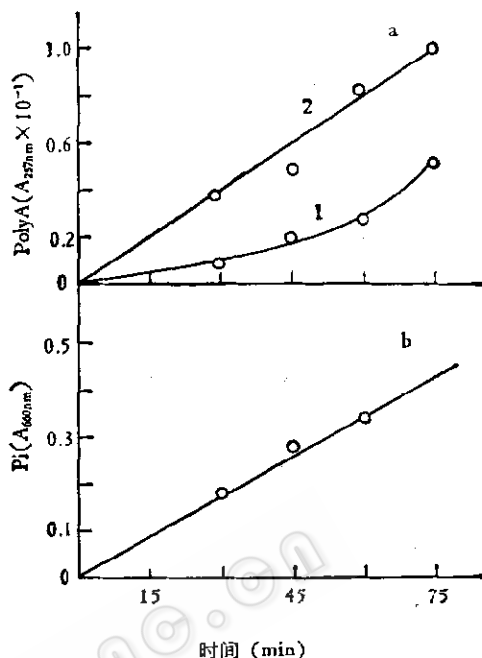


图 1 固定化 PNP 酶反应动力学

Fig. 1 Polymerization kinetics during the first and second assay

a. Poly A, b. Pi

首次测定 1st. assay 重复测定 2nd. assay

Reaction mixture 9 ml: Immobilization PNPase 2g. The mixture was incubated at 37°C with constant stirring. Aliquots were withdrawn at intervals indicated. The reaction was followed by the synthesis of Poly A (a) and liberation of phosphate (b).

同,其原因可能是 Pi 分子量小,易于通过载体琼脂糖的网状结构扩散到溶液中,所以各次测定结果一致。而 Poly A 或因分子量大,不易扩散,滞留于载体内,或因与酶本身有一定的亲和力处于结合状态。已知有些核酸关联酶,能与多核苷酸相结合^[4-7]。可以设想,首次反应与重复反应都产生了等量的 Poly A,但因部分被载体或酶所保留,表现出 Poly A 量有差异。

(二) 从特异性吸附与非特异性吸附的比较,考察酶与多核苷酸的结合

被保留在载体或酶上的 Poly A,情况

表 2 固定化 PNP 酶首次与重复测定时无机磷释放量的变化

Table 2 Amounts of P_i liberated in successive assays

测定 Assay	1st.	2nd.	3rd.	4th.
P_i (A_{660nm})	0.31	0.30	0.32	0.31

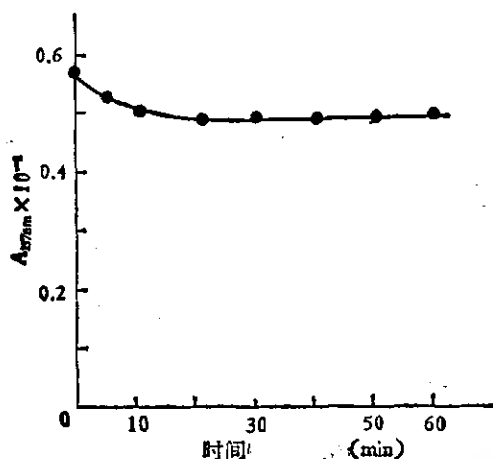


图 2 载体对 Poly A 非特异吸附

Fig. 2 Non-specific adsorption of Poly A on carrier (ABSE-agarose)

可能是不同的。一种是简单的物理吸附，另一种是酶的特异性结合。为了区别两种情况，进行了以下试验。

1. 非特异性吸附

取未与酶偶联的载体，悬浮于 Poly A 溶液中。在 37℃ 搅拌，于不同时间取上清液，测定其吸光度。从图 2 可见，载体对 Poly A 略有吸附。经 30 分钟处理后，对 Poly A 的吸附量达到平衡，吸附量约为 15%。灭活的固定化酶也有同样的吸附情况。被吸附的 Poly A 可用水洗涤回收。如再用缓冲液抽提，所得的吸光度小于 0.05。由于这种吸附与酶无关，属于非特异性吸附。

2. 特异性吸附

将经过首次反应后的固定化酶，先用

水洗至洗液中无紫外吸收，即除去了因载体物理吸附的少量 Poly A，再用测活性的无底物缓冲液于 37℃ 浸泡，搅拌，抽提 10 分钟后过滤，按测定酶活力同样操作，检测 Poly A。由表 3 可知，抽提液中确实含有 Poly A。如将两次抽提量与第一次反应测得量合并，则与不经抽提反应的第三、第四次聚合量相等。说明此抽提所得 Poly A 为第一次反应产物，占所生成 Poly A 的 45.5%。

以上试验表明，抽提所得 Poly A 与有活性的酶有关，即为在聚合过程中与酶相结合的多核苷酸。联系到 PNP 自然酶的聚合反应机制为“连续”方式，即核苷酸残基一个一个地连接到多核苷酸上，反应产物与酶相结合，等到一轮反应終了，形成了一定大小的多核苷酸，才从酶分子上释放出来，再重新合成另一个多核苷酸^[8]。从固定化酶与多核苷酸结合情况来看，是否固定化酶聚合反应机制也为“连续”方式？

(三) 从固定化酶聚合反应产物分析来探讨固定化酶聚合反应机制

固定化酶如按“连续”方式进行聚合反应，除了在反应过程中不断形成与酶相结合的多核苷酸以外，在反应产物中只能含有达到一定长度的多核苷酸。反之，反应液中将会出现各种不同长度的寡聚物。由于酶经过固定化，极易与反应液分离，则为分析产物提供了便利条件。

固定化酶于 37℃ 聚合反应后，抽滤除去固定化酶，按 Stachelin 等人^[9]的 DEAE 纤维素层析方法，检查反应液中反应产物，并以聚合反应底物 ADP 和产物 Poly 作一已知混合物平行对照洗脱图谱（图 3）。由图 3a 及 b 可以看出，反应液与对照具有同样的洗脱图谱，即只含有剩余底物 ADP 和反应产物多核苷酸，未检查出其他中间寡聚物，说明固定化酶催化聚合反应的机制

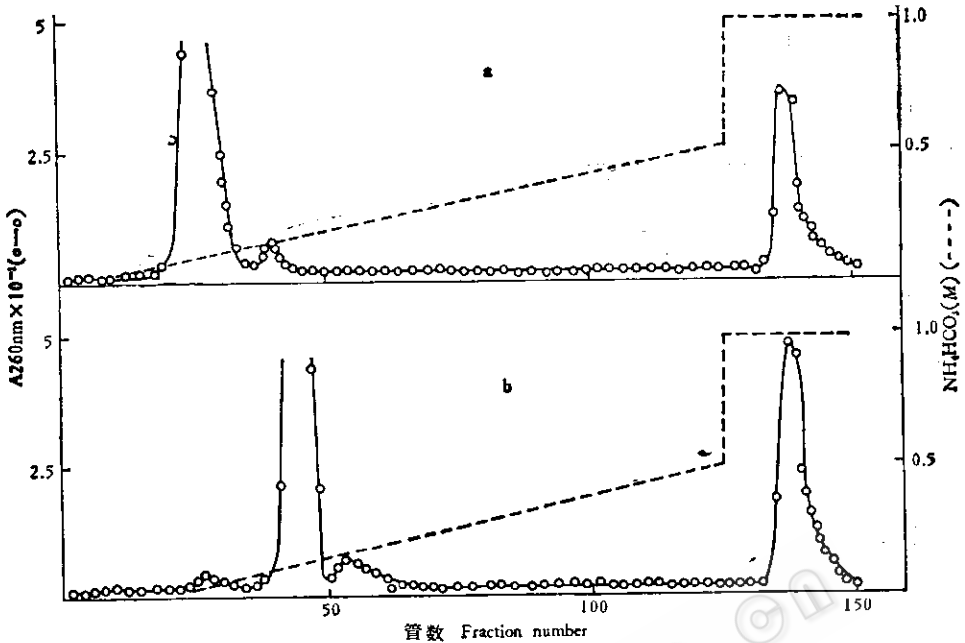


图3 DEAE 纤维素柱层析分析聚合反应产物

Fig. 3 Analysis of polymerization products released from immobilized PNPase by using DEAE-cellulose chromatograph

a. 反应液柱层析 b. ADP、Poly A 混合液(对照)柱层析

a. The polymerization mixture (5ml) was adsorbed on DE-32. The column (1.2 × 20cm) was eluted first with a linear NH_4HCO_3 gradient(0.01—0.5M)and then with 1M. Fractions about 4ml were collected and the absorbance at 260 nm was monitored.

b. Mixture of ADP and Poly A used as standard was adsorbed and eluted as described under a.

表 3 缓冲液抽提对固定化酶活力的影响

Table 3 Effect of extraction on successive assay

测 定 Assay	表现活力 Apparent activity Poly A ($A_{257\text{nm}} \times 10^{-1}$)
1 1st.	0.61
1st. extraction	0.33*
2nd. extraction	0.18*
2 2nd.	0.76
3 3rd.	1.09
4 4th.	1.18

* 抽提液中 Poly A 含量 Contents of Poly A in extracts

来。反应液中才开始出现“自由”的多核苷酸。随着聚合反应的进行，“自由”的多核苷酸逐渐增加。

由此可见,不论自然酶或固定化酶,在反应过程中全部的聚合量应包含与酶相结合的和“自由”的两种多核苷酸。只是在自然酶反应的情况下,因终止反应采用 HClO_4 或酒精沉淀,无法区分结合态与“自由”态。而固定化酶的终止反应,采用过滤分离方法,因此与酶相结合的多核苷酸能和反应液中的“自由”的多核苷酸分开。

“连续”式的聚合反应机制可以说明首次测定 Poly A 含量偏低和反应前期有停滞现象的原因。因为第一次反应的开始阶段所合成的多核苷酸为结合状态,不可能从反应液中检测出。而重复反应(或反应

为“连续”式。即固定化酶聚合反应过程中,酶与其本身所合成的多核苷酸相结合,产物达到一定链长以后才从酶分子上释放出

表 4 固定化 PNP 酶在 ADP 溶液中保存前后表现活力变化情况

Table 4 Change of immobilized PNPase activity after treatment with ADP (in Tris-HCl) at 0—6°C

保存时间(天) Duration of storage (days)	酶活力 Activity (Poly A, $A_{257nm} \times 10^{-1}$)			
	处理前 Before treatment		处理后 After treatment	
	第一次 1st.	第二次 2nd.	第一次 1st.	第二次 2nd.
30	0.53	1.44	1.22	1.45
80	0.61	1.09	0.65*	1.07

* 测定前缓冲液抽提 Immobilized enzyme was extracted with buffer solution before assay.

表 5 低温条件下 (0—6°C) 固定化酶聚合反应

Table 5 Polymerization catalyzed by immobilized PNPase without addition of divalent cation (Mg^{2+} or Mn^{2+}) during 0—6°C

底物 Substrate	浓度 Concentration ($\mu M/ml$)	pH	不同时间(天)聚合百分数 Conversion after incubation for different days (%)			
			8	15	25	30
ADP	7.16	9	3.7	12.3	34.0	56.8
CDP	5.47	9	10.0	17.1	32.6	44.4
IDP	8.04	8	10.0	—	18.2	20.7

后期)时,固定化酶是以酶-Poly A 相结合状态起始,新合成的 Poly A 不断与酶相结合,同时又有 Poly A 从酶分子上释放到反应液中。因此反应液中的 Poly A 净积累比第一次高。当用盐溶液将结合状态的 Poly A 抽提除去,固定化酶又从不带或带有少量 Poly A (抽提不完全)起始反应(表 3 第二次)。则与首次或前期反应的情况一样。

(四) 低温条件下酶与多核苷酸复合物的形成

为了研究底物对酶的保护作用,将新制备的固定化酶等分二份,一份测活力,另一份浸入 10 mM ADP-0.12M pH 9 Tris 溶液中,于 0—6°C 存放 30 天以上再测活力,二者分别代表保存前后酶的活力。实验结

果表明,保存后的酶活力明显高于保存前的酶活力,当连续测定时不存在首次活力偏低的现象,且与保存前的第二次测定结果没有显著的差异(表 4)。这一现象说明了在低温条件下,虽然不外加二价金属离子,酶与底物长期保存,仍有聚合反应进行,所合成的 Poly A 也与酶相结合;保存处理后的首次测定,酶是以与 Poly A 结合状态起始反应,所以才表现出第一、二次测定无显著差异。如用缓冲液抽提除去结合的 Poly A,则保存前后首次测定中所检测出的 Poly A 量几乎无区别(表 4)。

进一步的实验表明,在低温条件下,不外加二价金属离子,固定化酶不仅对 ADP 有聚合反应,对 IDP, CDP 也都能进行聚合

反应(表 5)。在 37℃ 24 小时对 ADP 的试验结果(图 4) 显示出在不外加二价金属离子条件下, 也有明显可检测出的聚合反应, 只是速度缓慢, 加上最初形成的 Poly A 由于与酶相连, 在前数小时内反应液中几乎得不到明显的 Poly A 聚合量。以往的试验^[3]聚合时间都较短, 这一现象易被忽略。在同样条件下, 对自然酶进行试验, 如图 4 所示, 在 24 小时内几乎无聚合反应。为何固定化酶在不外加金属离子的条件下, 也能催化聚合反应? 这可能是因为载体琼脂糖中含有微量二价金属离子, 也可能是固定化后, 改变了酶对金属离子的要求, 这些均有待于进一步研究。

(五) 固定化酶的稳定性

前文已报道固定化酶柱反应器具有良好的操作稳定性^[3]。近年来工厂使用固定化 PNP 酶制备 Poly I, Poly C, 批式反应超过 680 次。这样高的稳定性是少有的, 因此有必要探讨其原因。

1. pH 对稳定性的影响: 将固定化酶在不同 pH 条件下, 于 55℃ 加热 30 分钟, 然后测定剩余活力。如图 5 所示, 在 pH 8 较为稳定。如在 37℃ 处理 15 小时, 则 pH 稳定范围较宽为 pH 6—9 (图 5)。于低温 (0—6℃) 保存 30 天后, 在 0.12 M Tris-HCl, pH 9 条件下保持 90% 原酶活力。在水中 (约 pH 5) 则下降至 50% 以下。由此可见, 固定化酶稳定性与 pH 有关。

2. 金属离子、ADP、多核苷酸对固定化酶的保护作用: 由表 6 可知, 在 55℃ 30 分钟热钝化时, 底物 ADP, Poly A 及金属离子 Mg^{2+} , K^+ 均有明显的保护作用, 其顺序为: ADP > Poly A > Mg^{2+} , K^+ 。

此外, 在保存实验中, 曾将未经反应的固定化酶保存在 ADP (表 4) 或 Poly A 溶液中, 经多次试验, 用 Poly A 保存的效果比用 ADP 的差。这与文献报道^[10]多核

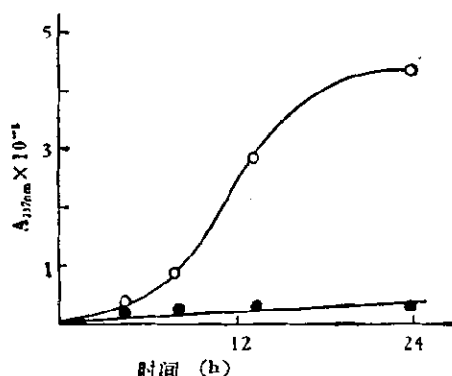


图 4 不外加二价金属离子 ADP 不同时间的聚合反应

Fig. 4 Time course of Poly A synthesis without addition of divalent cation at 37°C. Reaction mixture: Tris-HCl 0.12M pH9; ADP 8μM/ml.

○—○ 固定化酶 Immobilized enzyme
●—● 自然酶 Native enzyme

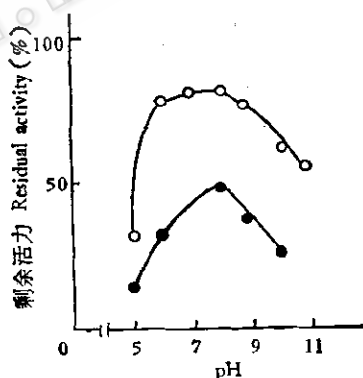


图 5 固定化 PNP 酶对 pH 的稳定性

Fig. 5 pH stability of immobilized PNPase.

pH 5.0—6.1 Tris-maleate 0.12 M
pH 7.0—9.2 Tris-HCl 0.12M
pH 10.1 Glycine-NaOH 0.12M

○—○ 37℃; ●—● 55℃

苷酸比核苷二磷酸对 E. coli PNP 酶有较好的保护作用有所不同。分析其原因, 可能是经过固定化后, 降低了酶与多核苷酸的亲和力^[11], 而固定化酶和自然酶一样对 ADP 有相同的米氏常数^[3,11]。

综上所述, 维持固定化酶高度稳定, 原

表6 金属离子 Poly A 及 ADP 对固定化 PNP 酶热钝化的保护作用

Table 6 Protection of Immobilized PNPase against heat inactivation by metal ions, Poly A and ADP

55℃ 处理 30 分 Incubated at 55℃ for 30 min. in	剩余活力(%) Remained Activity(%)
Tris-HCl pH9	49.7
Mg ²⁺ , K ⁺ (in Tris-HCl, pH9)	58.2
Poly A (in Tris-HCl, pH9)	67.2
ADP (in Tris-HCl, pH9)	89.7

因是多方面的。除了固定化提高了自然酶的稳定性外,运转时采用 pH 8—9, Mg²⁺与底物的存在都有利于保持酶的稳定性。

在实践中还发现,采用批式反应时,如反应后用缓冲液搅拌洗涤固定化酶,则显著降低酶的寿命。其原因很可能是因为除去了与酶结合的多核苷酸。表6的结果显示 ADP 对酶有保护作用,但由于 ADP 与酶结合后,随即有多核苷酸形成,因此这种保护作用,可能与酶-多核苷酸复合物的形

成有关。综合分析影响酶稳定性的诸因子,可以认为载体-酶-多核苷酸三元复合物的形成起决定性作用,它是保持酶稳定性的较好构象形式。

参 考 文 献

- [1] 杨开宇等:生物化学与生物物理学报, 11: 79—87, 1979。
- [2] Fuwa, Ichiro et al: *J. Biochem. (Japan)*, 59: 95—103, 1966.
- [3] 杨开宇等:生物化学与生物物理学报, 11: 97—104, 1979。
- [4] Chen, P. S. et al: *Anal. Chem.*, 11: 1756—1758, 1956.
- [5] Nossal, N. G. et al: *J. Biol. Chem.*, 243: 913—922, 1968.
- [6] Fox, C. F. et al: *J. Biol. Chem.*, 240: 2101—2109, 1965.
- [7] Jones, W. et al: *J. Mol. Biol.*, 22: 199—209, 1966.
- [8] Thang, M. N. et al: *J. Mol. Biol.*, 53: 261—280, 1970.
- [9] Staehelin M. et al: *Arch. Biochem. Biophys.*, 85: 289—292, 1959.
- [10] Lucas, J. M. et al: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17: 395—400, 1964.
- [11] Vang, N. H. et al: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90: 606—614, 1979.

STUDIES ON IMMOBILIZED POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE

III. THE FORMATION OF IMMOBILIZED POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE-POLYNUCLEOTIDE COMPLEX

Liu Nianjuan Zhang Yuying Yang Kaiyu

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

The polynucleotide synthesized by immobilized PNPase was bound with the enzyme during polymerization forming an enzyme-polynucleotide complex. The use of immobilized enzyme facilitates the isolation of the complex with the easy separation of immobilized enzyme from reaction mixture. Analysis of polymerization products showed that no intermediate oligonucleotides were found and only remained substrates and polymers with a high molecular weight could be detected. These results suggest that polymerization process catalysed by immobilized PNPase involves a processive mechanism.

When immobilized PNPase was incubated with substrate ADP, CDP or IDP at optimum pH 8—9 for a long time without addition of divalent cation polymerization did occur, and the synthesized polynucleotides were also bound with the enzyme molecules. Under identical conditions no polymerization was detected with native PNPase, this difference might be due to either the presence of small amount of divalent cation

on the carrier of ABSE-agarose or the unusual property caused by immobilization. Anyway, the presence of substrate (without addition of Mg^{2+}) and thereafter the formation of enzyme-polynucleotide complex remarkably enhanced the stability of immobilized enzyme.

The immobilized PNPase has been used more than 680 times. In addition to the immobilization, the superior operation stability of immobilized PNPase is due to the substrate and polynucleotide protection. Divalent cation (Mg^{2+}) and pH 8—9 also exhibited good effects on the stability of enzyme, among all these factors the polynucleotide bound with the enzyme during polymerization greatly contributed to the stability of immobilized PNPase. Probably, the ABSE-agarose carrier-enzyme-polynucleotide ternary complex provides the best conformation for the stability of enzyme.

Key words

Immobilize; Polynucleotide phosphorylase (PNPase)