

微生物多核苷酸磷酸化酶的研究

谢伯泰 徐锦章 沈俭

张连成 陈超 吴富强

(陕西省微生物研究所, 西安)

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测不同来源细菌、酵母菌和真菌中的多核苷酸磷酸化酶 (PNPase), 发现它在微生物界分布极广。大多数细菌 PNPase 的分子量都与大肠杆菌的相同。也发现 PNPase 普遍存在有多组份现象。有些菌株的 PNPase 对蛋白酶敏感, 在提酶时被降成多个分子量不同的活性部分。也有一些菌株 PNPase 的多组份在提酶之前就存在。作者得到一些可以向细胞外分泌 PNPase 的菌株, 其胞外 PNPase 可以用于 Poly(1:C) 的合成。

关键词 多核苷酸磷酸化酶; 聚肌胞

多核苷酸磷酸化酶 (Polynucleotide phosphorylase; E.C.2.7.7.8) 简称 PNPase。它在核酸结构研究和核苷酸片段合成中都是一个很重要的酶。自从 1955 年被 Grunberg-Manango, M. 等人^[1]发现之后, 已经对它有了较多的了解, 尤其是对于研究得比较深入的几种来源的 PNPase 的分离纯化、结构与功能以及酶的作用原理都进行了深入的研究^[2,3]。近年来, PNPase 在多核苷酸合成中的应用, 特别是 Poly(1:C) 的生产受到重视。作者为了寻找适于生产 PNPase 的菌株, 对土壤微生物中的 PNPase 作了调查, 对不同来源的 PNPase 活性的多组份现象和某些菌株的胞外酶作了研究。

材料和方法

(一) 菌株来源

本试验使用的菌株, 一部分来自本所菌种组, 一部分是从土壤中分离的。大肠杆菌 (A.S1.183) 由中国科学院微生物研究所提供。

(二) 菌株培养条件

1. 真菌培养基和培养条件: 菌株在马铃薯琼脂斜面培养基 (20% 的马铃薯浸汁、2% 葡萄糖、2% 琼脂、pH6—8) 上活化两次后, 转入 250ml 三角瓶 (每瓶 50ml 培养液) 中, 28°C 培养 14 小时。摇床振幅 5cm, 110 次/min。液体培养基为 (%): 葡萄糖 3、蛋白胨 1、酵母膏 0.3、硫酸铵 0.25、K₂HPO₄ 0.15、MgCl₂ 0.1、pH5.8—6.0。每瓶加两滴液体石蜡, 10 磅灭菌 30 分钟。

本文于 1986 年 10 月 27 日收到。

文中采用的英文缩写符号:

ADP-Na₂: 腺苷二磷酸二钠; EDTA: 乙二胺四乙酸; Poly(A): 多聚腺苷酸; Poly(C): 多聚胞苷酸; Poly(I): 多聚肌苷酸; Poly(1:C): 聚肌胞; Tris: 三羟甲基氨基甲烷; PMSF (Phenylmethyl-sulfonyl fluoride): 苯甲磺酰氟; PNPase (Poly-nucleotide phosphorylase): 多核苷酸磷酸化酶。

为本实验提供土壤样品的有: 杭州大学生物系胡华萃, 杭州第三制药厂韩晓旭, 中国科学院华南植物研究所丁明懋, 成都第三制药厂李守让和余声, 北京轻工业部食品局袁惠民, 武汉大学生物系周锡良等同志。中国科学院上海植物生理研究所熊瑞身研究员帮助审稿一并致谢。

2. 酵母培养基和培养条件: 菌株在麦芽汁琼脂斜面上活化两次后, 转接摇瓶培养, 培养条件与真菌的相同。液体培养基为(%) : 葡萄糖 2、蛋白胨 1、酵母膏 0.5、液体石蜡两滴、自然 pH。8 磅灭菌 30 分钟。

3. 细菌培养基和培养条件: 培养基为(%) : 蛋白胨 1、酵母膏 0.5、牛肉膏 0.5、NaCl 0.5、琼脂 2、pH7.2—7.4。菌株在上述培养基上活化两次, 转接摇瓶, 38℃ 培养 16 小时(液体培养基不加琼脂)。

(三) PNPase 的提取和纯化

1. 细胞内 PNPase 的提取和纯化: 离心收集菌体, 用生理盐水洗涤一次, 加两倍体积提酶液(Tris-HCl 0.1 mol/L, EDTA 0.001 mol/L pH8.0), 用超声波(4—10℃)处理 20 分钟。5,000 × g 离心 20 分钟得粗酶液。将粗酶液按照杨开宇等人^[4]的方法处理, 得到部分纯化的 PNPase。

2. 细胞外 PNPase 的浓缩和纯化: 培养物离心除菌体后, 用 QY-5 超滤膜(上海轻工业研究所产品)浓缩得粗酶液。粗酶液的纯化与上述方法相同。

(四) PNPase 凝胶电泳

不同菌株 PNPase 的鉴定, 可以直接用细胞提取的粗酶液或分离除细胞后的培养液进行电泳。电泳采用 Tris-甘氨酸不连续垂直板(10 ×

10 × 0.2cm) 凝胶。分离胶 7.5%、pH8.9; 浓缩胶 4%、pH6.7。电泳缓冲液: Tris-甘氨酸 0.039 mol/L, pH8.3。电流 30mA。电泳后的胶用蒸馏水冲洗, 然后置反应液(Tris-Cl 0.4 mol/L, pH9.0, KCl 0.2 mol/L, EDTA-Na₂ 0.002 mol/L, MgCl₂ 0.06 mol/L, ADP-Na₂ 0.01 mol/L)中, 37℃ 保温 6 小时。用 7% 的乙酸固定 10 分钟。用含 0.2% 次甲基蓝的乙酸(7%)液染色 2 小时, 自来水漂洗脱色。

(五) 其它测定方法

PNPase 活性、蛋白质的测定和 Poly(1)、Poly(C) Poly(I:C) 分子量的测定分别按文献[5]、[6]和[7]进行。

结果和讨论

自 Grunberg-Manango, M. 等人^[1]从棕色固氮菌中发现 PNPase 以后, 至今有关 PNPase 的研究报道将近 500 篇。其中涉及到能产生 PNPase 的细菌有 23 个属 39 个种。此外, 在真菌、烟草、大麦、燕麦、海藻、鼠、猪、蛔虫、小鸡胚以及人精中都发现有 PNPase 的存在。

(一) 不同菌株中 PNPase 的电泳检

表 1 不同菌株中 PNPase 的分布
Table 1 The distribution of PNPase in various microorganisms

菌类 Microbial kind	检测的菌株数 Number of strains	产 PNPase 的菌株 Strains with PNPase		PNPase 活性高的菌株 Strains with powerful activity		向细胞外分泌 PNPase 的菌株 Strains of showing activity in the fermented liquid	
		株数 Number	%	株数 Number	%	株数 Number	%
真菌 Fungi	1651	102	9.7	13	1.2	—	—
酵母菌 Yeast	140	4	2.8	—	—	—	—
细菌 Bacteria	1359	734	54.0	71	5.2	6	0.4

注: PNPase 活性高的菌株是指从每升培养物收集的细胞中能得到 240 单位以上 PNPase 的菌株。酶活单位按每小时合成 IOD₂₆₀ Poly(A) 计算。

Note: The strains with powerful PNPase activity were the strains with activity more than 240 unit/L of fermented liquid (The unit is the synthesis of IOD₂₆₀ Poly(A) in an hour).

测

作者由 2550 株土壤微生物产生 PNPase 的凝胶电泳测定结果(表 1)表明: PNPase 在微生物界是广泛分布的, 特别是细菌。被检测的细菌中半数以上都有 PNPase。在部分真菌中也可以检出 PNPase 活性。在酵母菌中 PNPase 检出率较低。有些菌株检不出 PNPase 活性, 或活性较弱, 这是否与其细胞壁不易破碎有关, 尚有待研究。

(二) 不同菌株 PNPase 的多组份现象

聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明: 大多数细菌 PNPase 与大肠杆菌 PNPase 比较相似。从电泳谱上可以看出, 不同菌株 PNPase 的分子量比较接近(图 1), 在同样条件下都能很好地促进 Poly (A) 的合成。另一方面大多数菌株的 PNPase 不同程度的存在多组份现象(图 2, 图 3)。

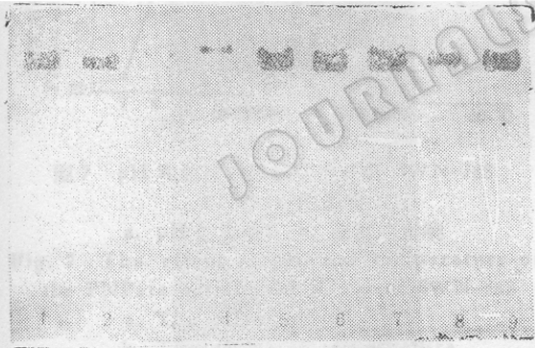


图 1 几种细菌与大肠杆菌 PNPase 的电泳比较
Fig. 1 Comparison of gel electrophoresis patterns of PNPase from some bacteria with that of the *E. coli*

- Number of bacteria
1. 1240 2. 1064 3. 733 4. 628 5. 608
6. 580 7. 584 8. *E. coli* 9. 388

Letendér, C. H. 等人^[8]在研究藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus* Cohn) PNPase 时指出: PNPase 对蛋白酶特别敏感, 在提酶过程中它可能被降成分子量不同的多个活性组份。如果在提酶时加入蛋白酶抑制剂 PMSF 便可以得到天然状态的

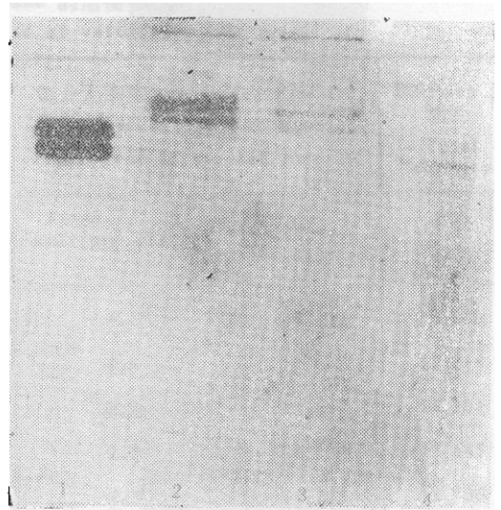


图 2 几种根霉与大肠杆菌 PNPase 的电泳比较
Fig. 2 Comparison of gel electrophoresis patterns of PNPase from some *Rhizopus* with that of the *E. coli*

1. *E. coli* 2. *Rhizopus* 240
3. *Rhizopus* 249 4. *Rhizopus* 251

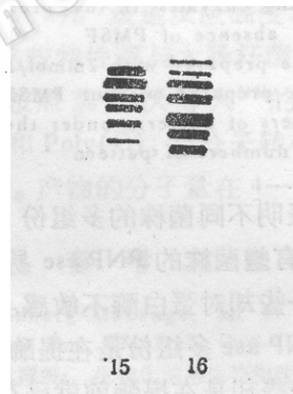


图 3 细菌 PNPase 电泳谱的多组份现象
Fig. 3 The multiple forms of PNPase of bacteria on gel electrophoresis
图下的数字是菌株编号
Numbers of bacteria under the numbers of patterns

PNPase, 它在电泳中只显示一条活性带。实际上 1967 年 Klee, C. B.^[9] 在大肠杆菌 (*E. coli*) 的 PNPase 中就发现了上述现象。

作者观察过的许多菌株, 大部分 PNPase 都表现出多组份现象。有一部分菌株提酶时加入 PMSF 就可以得到单一活性组份的 PNPase (图 4)。另一些菌株 PNPase 的多组份现象不受 FMSF 的影响

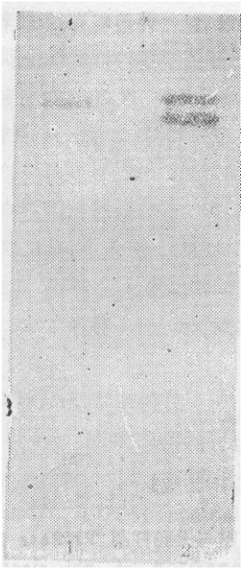


图4 PMSF对细菌菌株47 PNPase多组份的影响
1.提酶时加2mmol/L的PMSF
2.提酶时不加PMSF

Fig. 4 The multiple forms of bacterial PNPase when extracting enzymes in the presence and absence of PMSF

1. The enzyme prepared with 2mmol/L PMSF
 2. The enzyme prepared without PMSF
- Numbers of bacteria under the numbers of pattern

(图5, 6),表明不同菌株的多组份 PNPase 是不同的。有些菌株的 PNPase 易被蛋白酶降解,另一些却对蛋白酶不敏感。也有一些菌株的 PNPase 多组份是在提酶过程中产生的,另一些却是在提酶前就已存在。

(三) 胞外的 PNPase 及其酶学性质

1973年 Арбузов 等人^[10]指出:大肠杆菌中70—80%的 PNPase 与核糖体结合,20—30%是以游离形式存在于细胞质中。所以一般认为 PNPase 属于胞内酶。1977年 Hunt 等人^[11]虽然在苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti* Dangeard) 的无细胞培养物中发现了非常高的 PNPase 活性,但是目前报道能向细胞外分泌 PNPase 的菌株尚少。

作者分离到一批可以向细胞外分泌 PNPase 的菌株,其中有蜡状芽孢杆菌

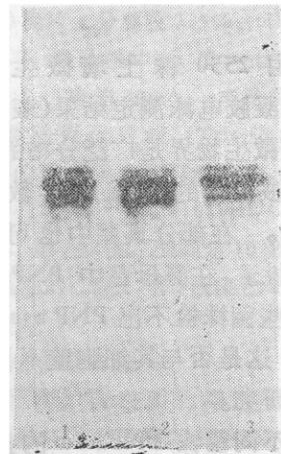


图5 PMSF对细菌菌株1457 PNPase多组份的影响
提酶时不加PMSF(1),加2mmol/L PMSF(2);
加4mmol/L PMSF(3)。

Fig. 5 The multiple forms of bacterium (1457) PNPase in the presence of PMSF

1. The enzyme prepared without PMSF
2. The enzyme prepared with 2mmol/L PMSF
3. The enzyme prepared with 4mmol/L PMSF

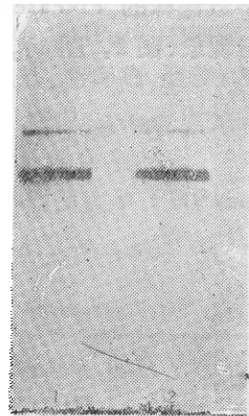


图6 PMSF对霉菌N-17株 PNPase多组份的影响
提酶时不加PMSF(1),加2mmol/L PMSF(2)。

Fig. 6 The multiple forms of fungus (N-17) PNPase in the presence of PMSF

1. The enzyme prepared without PMSF
2. The enzyme prepared with 2mmol/L PMSF

(*Bacillus cereus*) SWN-388、580、584、608、1064和带疫无色杆菌 (*Achromobacter peflifer*) SWN-733等(表2)。按上述超滤浓缩方法制备胞外粗酶液,然后经DEAE-纤维素柱分离^[4]得到部分纯化的SWN-388胞外 PNPase。凝胶电泳证明:

表2 不同菌株中 PNPase 的活性
Table 2 The activity of PNPase of various strains

菌株 Strain	每升发酵液中收得细胞内的 PNPase The PNPase of celles in one litre of fermented liquid		每升无细胞发酵液中的 PNPase The PNPase in one litre of cell-free fermented liquid		PNPase 总活性 Total activity 单位 unit
	unit/mg protein	单位 unit	unit/mg protein	单位 unit	
<i>B. cereus</i> SWN-388	6.0	430	4.8	25,400	25,830
<i>B. cereus</i> SWN-580	7.4	553	2.4	10,670	11,224
<i>B. cereus</i> SWN-584	7.8	550	2.7	13,630	14,181
<i>B. cereus</i> SWN-608	7.5	515	2.5	13,130	13,645
<i>B. cereus</i> SWN-1064	8.0	495	2.5	13,210	13,706
<i>A. pestifer</i> SWN-733	2.7	333	3.1	13,080	13,414

注: PNPase 活性按每小时合成 1 OD₂₆₀ Poly(A) 定为一个酶活单位。

Note: The activity unit of PNPase is one unit of synthesis of 1 OD₂₆₀ Poly(A) in 1 h.

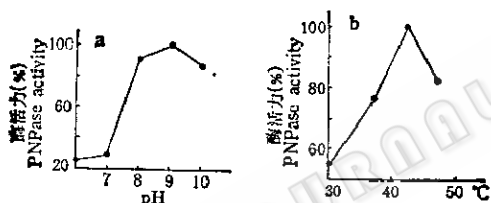


图7 pH和温度对蜡状芽孢杆菌 SWN-388 PNPase 的影响

a. pH 的影响; b. 温度的影响

Fig. 7 The effect of pH and temperature on the PNPase activity of *B. cereus* SWN-388

a. The effect of pH
b. The effect of temperature

表3 用 SWN-388 胞外 PNPase 合成 Poly(I) 或 Poly(C) 的克分子转化率

Table 3 The synthetic rate of Poly(I) or Poly(C) by the PNPase in fermented liquid of *B. cereus* SWN-388

重复次数 Number of test	Poly(I)%	Poly(C)%
1	52.4	55.1
2	48.0	49.0
3	52.5	—

它的分子量与大肠杆菌胞内 PNPase 相似。酶促合成 Poly(A) 的最适 pH 为 9

左右(图 7-a)。最适反应温度为 42°C(图 7-b)。这些特性都与大肠杆菌的 PNPase 相同。按照黎高沃等人^[12]的方法合成 Poly(I) 和 Poly(C), 克分子转化率 50% 左右(表 3)。产物的分子量在 4—10S 之间。

参 考 文 献

- [1] Grunberg-Manango, M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 3165, 1955.
- [2] 谌章群等: 生物化学与生物物理进展, **5**: 15—21, 1979.
- [3] 刘新垣等: 生物化学与生物物理进展, **6**: 10—15, 1979.
- [4] 杨开宇等: 生物化学与生物物理学报, **11**(1): 79—87, 1979.
- [5] 李楠茜等: 生物化学与生物物理进展, **1**: 35—37, 1981.
- [6] 蒋傅葵: 化学试剂, **3**: 49, 1980.
- [7] 谢伯泰等: 工业微生物, **1**: 25—26, 1985.
- [8] Letender, C. H. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **2**(2): 149—163, 1975.
- [9] Klee, C. B.: *J. Biol. Chem.*, **242**: 3579—3580, 1967.
- [10] Арбузов, В. А. ит. л.: *Биохимия*, **38**(5): 635—637, 1973.
- [11] Hunt, R. E. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **102**: 403—411, 1977.
- [12] 黎高沃等: 生物化学与生物物理进展, **1**: 38—40, 1981.

STUDIES ON MICROBIAL POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE

Xie Botai Xu Jinzhang Shen Jian Zhang Liancheng Chen Chao Wu Fuqiang

(*Shaanxi Institute of Microbiology, Xi'an*)

A screening for production of polynucleotide phosphorylase (PNPase) in bacteria, yeasts and fungi by using polyacrylamide gel electrophoresis has been performed. The results show that PNPase is widely distributed. The molecular weight of the bacterial PNPase is the same as that of *E. coli*. The PNPase of some strains could be degraded by proteinase during isolation to form the multiple

forms. Others are hardly affected by proteinase. There are some strains that are able to secrete the PNPase out of the cell, and it can be used to synthesis poly (I:C).

Key words

Polynucleotide phosphorylase; Poly (I:C)