

臭味假单胞菌 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶的提纯和性质*

李 敏

(中国科学院微生物研究所, 北京)

L. Nicholas Ornston

(Department of Biology, Yale University, New Haven, CT 06520, USA)

从臭味假单胞菌中提纯了 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上是均一的, 比活力提高 113 倍。该酶分子量为 152000, 每个酶分子包含 4 个相同的亚基, 亚基分子量为 40000。用电泳聚焦电泳测得该酶的等电点 pI 为 6.5。

关键词 臭味假单胞菌; β -酮己二酸单酰辅酶 A; 硫解酶

很早以前, 人们就发现许多需氧的细菌和真菌能够以脂肪烃和芳烃做为唯一的碳源和能源, 这反映了在这些微生物体中存在着转化这些化合物的有关的酶及特殊的代谢途径^[1,2]。1955 年, Mason^[3] 和 Hayaishi^[4] 分别发现了单加氧酶和双加氧酶。以后进行了大量关于烃代谢途径的研究。在芳烃代谢中提出了 β -酮己二酸代谢途径^[5-7]。许多芳烃及其衍生物, 例如, 苯甲酸、对-羟基苯甲酸、3, 4-二羟基苯甲酸、邻氨基苯甲酸、酚、苯、甲苯、烷基苯和萘等, 通过一系列降解过程都能生成 β -酮己二酸^[8], 所以这个降解过程叫做 β -酮己二酸代谢途径。 β -酮己二酸再通过 β -酮己二酸琥珀酰辅酶 A 转移酶和 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶的催化生成琥珀酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A, 从而使芳烃代谢与三羧酸循环偶联起来, 形成完整的物质和能量代谢过程。 β -酮己二酸代谢途径的提出对于微生物代谢的基础研究和应用方面都有重要作用。目前关于这条代谢途径的有关化学反应已经清楚, 所涉及的酶除 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶外, 都已进行了研究。我们从臭味假单胞菌中提纯了 β -

酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶, 进一步补充证实了 β -酮己二酸代谢途径。该酶催化 β -酮己二酸单酰辅酶 A 和辅酶 A 转化为琥珀酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A。本文报道臭味假单胞菌 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶的提纯及性质。

材 料 和 方 法

(一) 菌种和培养条件

本实验使用的菌种为臭味假单胞菌 PRS 2000 (*Pseudomonas putida* PRS 2000), 其特性见前报^[9]。培养基组成为 190.4 g KH_2PO_4 , 198.7 g Na_2HPO_4 , 100g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30.0g MgSO_4 , 6.6g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.8g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.17g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 碳源添加物 (25 mmol/L 己二酸盐和 5mmol/L 对-羟基苯甲酸盐), 加水定容到 100L, 调 pH 到 6.8 左右, 灭菌后备用。为制备 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶, 将臭味假单胞菌 PRS 2000 接种到 20L 培养基中, 在 28L New Brunswick Scientific (NBS) 发酵罐中, 于 30℃ 培养过夜, 再补加 100ml 1mol/L 对-羟基苯甲酸盐溶液, 每 4

本文于 1987 年 2 月 4 日收到。

* 本工作得到 Celanese 基金的支持, 实验工作是在美国耶鲁大学生物系完成的。Dr. Ka-leung Ngai 在实验方面给予热情帮助, Mr. Juanito Parales 在技术方面大力协助, 特此一并致谢。

至 6 小时加一次,直到发酵液 $OD_{600} \approx 3.0$ 。将以上 20 L 发酵液注入 200 L NBS 发酵罐的培养基中,继续发酵,每 4 至 6 小时加 1 L 1 mol/L 对-羟基苯甲酸盐,直到 $OD_{600} \approx 6.0$ (大约发酵两天)。将发酵液在冷冻离心机上离心收集菌体。将菌体在 -20°C 保存备用。

(二) 酶的分析

β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶活力测定在 Gilford 2400 型紫外分光光度计上进行。分析混

$$\text{酶活力} = \frac{[(\Delta A_{302}/\text{min})_{\text{样品}} - (\Delta A_{302}/\text{min})_{\text{空白}}] \times 0.02 \times 1000}{0.5 \times \text{酶的微升数}} \quad (\text{u/ml})$$

式中 0.02 和 0.5 为实验测定值,表示 0.02 微克分子产物可引起光吸收增加 0.5。1000 表示将样品的微升数换算为毫升数。

蛋白质浓度测定按 Lowry 法^[10]进行,以牛血清清蛋白作标准。

(三) 缓冲液

缓冲液 A 为 25 mmol/L 乙二胺, 100 mmol/L 2-巯基乙醇, 2 mmol/L 苯甲基磺酰氟和 10% 甘油,调到 pH 7.3。缓冲液 B 为 10 mmol/L 乙二胺, 5 mmol/L 2-巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA, 10% 甘油和 5 mmol/L 或 200 mmol/L 硫酸铵,调到 pH 7.3。缓冲液 C 为 50 mmol/L 磷酸钾, 5 mmol/L 2-巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 硫酸铵和 10% 甘油,调到 pH 7.2。缓冲液 D 为 5 mmol/L 2-巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 硫酸铵, 10% 甘油和 100 mmol/L 或 400 mmol/L 磷酸钾,调到 pH 6.2。

(四) 其它方法

聚丙烯酰胺凝胶电泳^[11]、凝胶过滤^[12]、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[13]和凝胶电聚焦^[14]分别参照有关文献进行。

(五) 材料

DEAE-纤维素 (DE-52) 和 P-11 磷酸纤维素为 Whatman Ltd. 产品。TSK HW-65F 凝胶购于 FM Science Inc.。凝胶电泳材料均为 Bio-Rad Lab. 产品。苯甲基磺酰氟、 β -酮己二酸盐、琥珀酸盐和辅酶 A 均为 Sigma 产品。

结 果

(一) β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶

合液包含 500 $\mu\text{mol/L}$ β -酮己二酸单酰辅酶 A, 100 $\mu\text{mol/L}$ 辅酶 A, 25 mmol/L β -酮己二酸盐, 40 mmol/L Mg^{2+} 和 200 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0。酶反应在比色杯中进行,加酶以后反应开始,记录光吸收值。在 25°C , 于上述条件下每分钟转化 1 微克分子 β -酮己二酸单酰辅酶 A 到 1 微克分子乙酰辅酶 A 和 1 微克分子琥珀酰辅酶 A 所需酶量定义为一个酶活力单位,酶活力计算公式如下:

的提纯

除注明者外,全部操作都在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 进行,用 Sorvall RC-5 型冷冻离心机离心。

1. 粗提液: 将 250g 冷冻的臭味假单胞菌细胞在低温室融化。然后悬浮在 250 ml 缓冲液 A 中,用超声波破碎细胞。在 $16000 \times g$ 离心 30 分钟,收集上清液。将沉淀悬浮在少量缓冲液 A 中,再用超声波破碎,离心,收集上清液。将两次的上清液合并,用缓冲液 A 定容到 1000 ml,即为粗提液。

2. 透析: 在粗提液中加入固体硫酸铵,达 0.4 mol/l,搅拌 1 小时,然后对含有 5 mmol/l 硫酸铵的缓冲液 B 透析 24 小时。 $16,000 \times g$ 离心 30 分钟,收集上清液。

3. DE-52 纤维素柱色谱: 在已平衡好的 DE-52 纤维素柱 ($2.6 \times 100\text{cm}$) 上加透析后的样品。用含有 5 mmol/l 硫酸铵的缓冲液 B 冲柱,然后用直线梯度 5—200 mmol/l 硫酸铵的缓冲液 B 进行洗脱。用部分收集器收集样品。 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶大约在 60 mmol/l 硫酸铵处被洗脱下来 (图 1)。将活力峰部分合并,即得 DE-52 纤维素柱提取液。

4. 硫酸铵分级沉淀: 在 DE-52 纤维素柱提取液中加入硫酸铵达 50% 饱和度,调 pH 为 7.0,搅拌 30 分钟, $16000g$ 离心 30 分钟,收集上清液。继续加硫酸铵达 70%

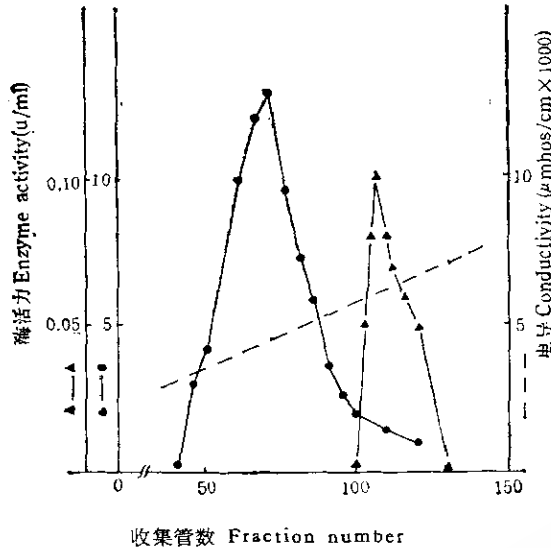


图1 臭味假单胞菌两种酶的 DE-52 纤维素柱色谱图

Fig. 1 Elution profile of the enzymes from *Pseudomonas putida* on a DEAE-cellulose (DE-52) chromatographic column

柱 (2.6×30cm) 用缓冲液 B 平衡, 5—200mmol/L 硫酸铵梯度洗脱, 每 3ml 收集一管。The column (2.6×100cm) was equilibrated with buffer B, A linear ammonium sulfate gradient 5—200mmol/L in 1L of the same buffer was used and 3ml fractions were collected.

▲—▲ β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶活力
 β -ketoadipyl-CoA thiolase activity
 ●—● 乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶活力
 Acetoacetyl-CoA thiolase activity

饱和度。重复以上操作, 得到 50—70% 硫酸铵饱和度的沉淀, 溶于缓冲液 C。

5. P-11 磷酸纤维素柱色谱: 将 50—70% 硫酸铵饱和度的沉淀样品对 2L 含 100mmol/L 磷酸盐的缓冲液 D 透析, 然后加到已用缓冲液 D 平衡好的 P-11 磷酸纤维素柱 (1.6×40 cm) 上, 用 100—400 mmol/L 磷酸盐梯度洗脱。每 3ml 收集一管。 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶大约在 160mmol/L 磷酸盐处被洗脱下来 (图 2)。将活力峰合并, 加入固体硫酸铵达 70% 饱和度, 将酶沉淀出来, 离心取沉淀, 再溶于 13ml 缓冲液 C 中。

6. 凝胶过滤: 将步骤 5 得到的样品加到 TSK HW-65F 凝胶柱 (1.6×70cm)

上, 用缓冲液 C 洗脱, 收集活力峰, 即得提纯的酶样品。

经以上各步骤将 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶提纯 113 倍 (表 1)。

(二) 纯度鉴定

将提纯的 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 呈现一个蛋白质带 (图 3), 说明该酶是均一的。

(三) 分子量和亚基分子量的测定

用 TSK HW-65F 凝胶柱过滤测定提纯的 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶的分子量为 152000 道尔顿 (图 4)。

用 Weber 等^[13]的方法进行提纯的 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 呈现一个区带。亚基分

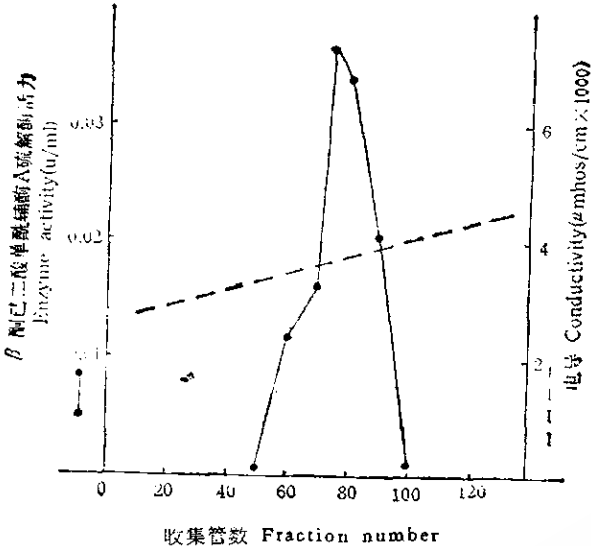


图2 臭味假单胞菌 β -酮己二酸单酰辅酶A 硫解酶的 p-11 磷酸纤维素柱色谱

Fig. 2 Purification of the β -ketoadipyl-CoA thiolase from *Pseudomonas putida* by chromatography on a phosphocellulose (P-11) column

该柱 (1.6×40cm) 用缓冲液 D, pH6.2 平衡, 100—400mmol/L 磷酸盐梯度洗脱, 每 3ml 收果一管。

The column (1.6×40cm) was equilibrated with buffer D pH6.2. A linear phosphate gradient 100—400mmol/L in 1000 ml of the same buffer was used and 3ml fractions were collected.

表1 臭味假单胞菌 β -酮己二酸单酰辅酶A 硫解酶的提纯结果

Table 1 Purification of the β -ketoadipyl-CoA thiolase from *Pseudomonas putida*

提纯步骤 Step	体积 Volume (ml)	总酶活 Total activity (u)	总蛋白质 Total protein (mg)	比活 Specific activity (u/mg)	酶活收率 Recovery (%)	提纯倍数 Purification (倍-fold)
1. 粗提液 Crude extract	800	160	52800	0.003	100	1.0
2. 透析样品 Dialyzed extract	730	132	26426	0.005	83	1.7
3. DE-52 纤维素柱洗脱样品 DEAE-cellulose (DE-52) eluate	576	57	684	0.083	36	27.7
4. 50—70% 硫酸铵饱和沉淀样品 50—70% Saturated ammonium sulfate fraction	12	25.2	187	0.135	16	45
5. P-11 磷酸纤维素柱洗脱样品 Phosphocellulose (P-11) eluate	12	10.8	45.6	0.237	7	79
6. 凝胶过滤样品 Gel filtration eluate	18	7.9	23.4	0.34	5	113

子量为 40000 道尔顿 (图 5)。从分子量
计算初步判定该酶分子包含 4 个相同的亚基。

(四) 等电点测定

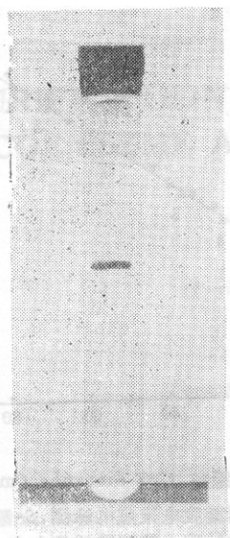


图3 提纯的 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 3 Polyacrylamide-gel electrophoresis of the purified β -ketoadipyl-CoA thiolase from *Pseudomonas putida*

加样 80 μ g 左右, pH 8.3, 胶的浓度为 7%, 用 0.05% 考马斯亮兰 R-250 染色, 7% 醋酸

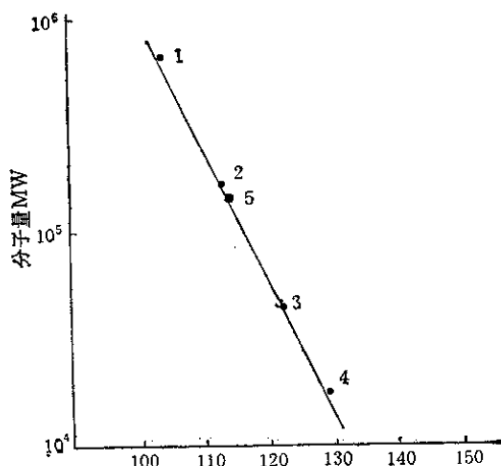
脱色。

Approximately 80 μ g of the thiolase was subjected to polyacrylamide-gel electrophoresis at pH 8.3 with 7% concentration gel. After electrophoresis at 3mA per tube for 3h the gels were stained for 2h with 0.05% Coomassie blue R-250 and destained in 7% acetic acid.

采用 Haglund^[44] 报导的园管凝胶电泳聚焦电泳的方法测定 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶的等电点。凝胶浓度 3.5%, 两性载体 Ampholine pH3—10。用 PHM64 型 pH 计测定凝胶各段的 pH 值。测得该酶的等电点 pI 为 6.5 (图 6)。

讨 论

1. 长期以来, 关于微生物为什么可以利用芳烃作为唯一的碳源和能源的问题一直引起人们的注意。经过许多科学家的长期努力, 提出了 β -酮己二酸代谢途径理论, 说明了微生物利用芳烃的物质代谢和



洗脱体积 Elution volume (ml)

图4 用 TSK HW-65F 凝胶柱过滤法测定 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶的分子量

Fig. 4 Molecular weight estimations of the β -ketoadipyl-CoA thiolase on a HW-65F column

凝胶柱: 1.6cm \times 90cm; 洗脱液: 缓冲液 C; 温度: 4 $^{\circ}$ C; 样品体积: 0.8ml; 监测器: UV(280nm)。

Gel bed: 1.6cm \times 90cm, Eluent: buffer C, Temperature: 4 $^{\circ}$ C, Sample load: 0.8ml, Detector: UV(280nm).

1. 甲状腺球蛋白(牛) Thyroglobulin (bovine) MW 670000
2. γ 球蛋白(牛) Gamma globulin (bovine) MW 158000
3. 卵清蛋白(鸡) Ovalbumin (chicken) MW 44000
4. 肌红蛋白(马) Myoglobin (house) MW 17000
5. 硫解酶 Thiolase MW 152000

能量代谢的过程。但是, 这条代谢途径上还有一个关键的酶—— β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶——虽然很早就预言其存在, 可是直到我们开始这项研究时还没有提纯它^[7]。我们提纯了 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶, 对于 β -酮己二酸的代谢途径理论提供了进一步证据。当然关于该酶的性质研究仅是初步的。

2. 我们在进一步研究中发现, 在臭味假单胞菌中同时存在四个酶: 乙酰乙酰琥珀酰辅酶 A 转移酶、乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、 β -酮己二酸琥珀酰辅酶 A 转移酶和 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶。这就形成了

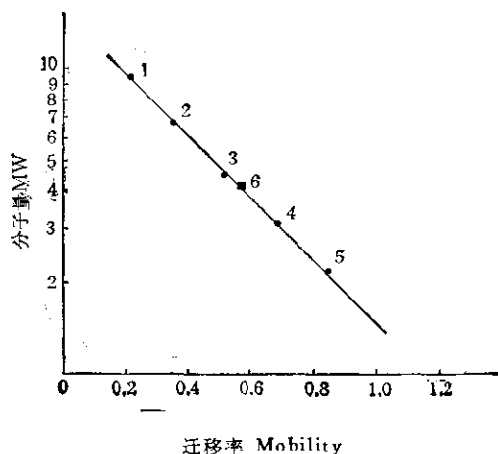


图5 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 β -酮己二酸单酰辅酶A 硫解酶亚基的分子量

Fig. 5 Determination of the subunit molecular weight of the β -ketoadipyl-CoA thiolase by SDS-gel electrophoresis

电泳在含有 SDS 的 10% 凝胶上进行。The electrophoresis was carried out in 10% acrylamide gels.

1. 磷酸化酶 B Phosphorylase B (97500)
2. 牛血清清蛋白 Bovine serum albumin (66000)
3. 卵清蛋白 Ovalbumin (45000)
4. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (31000)
5. 大豆胰蛋白酶抑制剂 Soybean trypsin inhibitor (21500)
6. 硫解酶 Thiolase (40000)

两条途径,即乙酰乙酸途径和 β -酮己二酸途径。看来在臭味假单胞菌中这两条途径可能是同时存在的。

参 考 文 献

- [1] Dalton, H.: *Hydrocarbons in Biotechnology*, (Ed. Harrison, D. E. F. et al.), Heyden and Son Ltd., London, p. 85—97, 1980.
- [2] Cain, R. B.: *Hydrocarbons in Biotechnology*, (Ed. Harrison, D. E. F. et al.), Heyden and Son Ltd., London, p. 99—132, 1980.
- [3] Mason, H. S. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 2914, 1955.
- [4] Hayaishi, O. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 5450, 1955.
- [5] Stanier, R. Y. et al.: *Advan. Microbiol. Physiol.*,

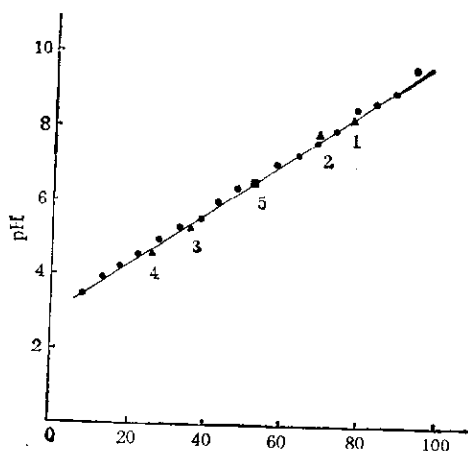


图6 用园管凝胶电泳测定 β -酮己二酸单酰辅酶A 硫解酶的等电点

Fig. 6 Determination of the isoelectric point of the β -ketoadipyl-CoA thiolase by tube gel electrofocusing electrophoresis

凝胶浓度 3.5% Acrylamide gel 3.5%, 两性载体 Ampholine pH3—10

1. 胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin (pI8.3)
2. 核糖核酸酶 A Ribonuclease A (pI7.8)
3. 胰岛素 Insulin (pI5.3)
4. 卵清蛋白 Egg albumin (pI4.6)
5. 硫解酶 Thiolase (pI6.5)

9: 89, 1973.

- [6] Stanier, R. Y. et al.: *Advances in Microbial Physiology*, (Ed. Rose, A. H. et al.), Academic Press, London and New York, p. 89—151, 1973.
- [7] Yeh, W. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 3794, 1982.
- [8] Doelle, H. W.: *Bacterial Metabolism*, 2nd Edition, Academic Press, New York, San Francisco, London, p. 499—557, 1975.
- [9] Parke, D. et al.: *J. Bacteriol.*, **126**: 272, 1976.
- [10] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [11] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404, 1964.
- [12] Inoue, K. et al.: 53rd Japan Biochemical Society, October, 1980.
- [13] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406, 1969.
- [14] Haglund, H.: *Method Biochem. Anal.*, **10**: 14, 1971.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF β -KETOADIPYL-COENZYME A THIOLASE FROM *PSEUDOMONAS PUTIDA*

Li Qin

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

L. Nicholas Ornston

(Department of Biology, Yale University, New Haven, USA)

The β -ketoadipyl-CoA thiolase from *Pseudomonas putida* has been purified 113-fold to homogeneity as judged by polyacrylamide-gel electrophoresis in our studies. The enzyme has a molecular weight of 152000, and is composed of four identical subunits. The subunit molecular weight is 40000. The

isoelectric point of the thiolase obtained by gel electrofocusing is pI6.5.

Key words

Pseudomonas putida; β -Ketoadipyl-Coenzyme A; Thiolase