

地中海诺卡氏菌丙氨酸脱氢酶的纯化和性质*

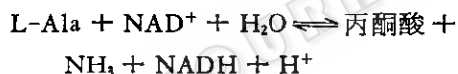
刁 蓉 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

采用硫酸铵分部沉淀、DEAE 纤维素-52 柱层析和亲和柱层析的方法, 分离纯化了地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) U-32 丙氨酸脱氢酶 (ADH), 用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一组分。以聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳测得丙氨酸脱氢酶的分子量为 228000, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得其亚基分子量为 38000, 表明地中海诺卡氏菌 U-32 丙氨酸脱氢酶由六个相同的亚基组成。ADH 加氨反应最适 pH 为 8.5, 脱氨反应最适 pH 为 11.5, ADH 的 pH 稳定范围在 pH 7.5—11.5。脱氨反应的最适温度为 50℃。ADH 的米氏常数 K_m 为: 丙酮酸 4.88×10^{-4} mol/L; NH_4^+ 4.03×10^{-3} mol/L; NADH 6.02×10^{-3} mol/L; L-Ala 7.45×10^{-3} mol/L; NAD^+ 6.67×10^{-3} mol/L。Hill 作图法求得 ADH 的 Hill 系数 n 为: ADH 对丙酮酸、NADH 和 NAD^+ 的 Hill 系数都为 1; 对 L-Ala 和 NH_4^+ 的 Hill 系数 n 值分别为 0.52 和 0.51, ADH 对 L-Ala 和 NH_4^+ 有负协同效应, 由此初步推测 ADH 是一个调节酶。

关键词 L-丙氨酸脱氢酶; 地中海诺卡氏菌 U-32; 纯化和性质

L-丙氨酸脱氢酶 (L-丙氨酸: NAD^+ 氧化还原酶, EC1.4.1.1) 简称 ADH, 可逆地催化 L-丙氨酸的脱氨反应:



ADH 在微生物的碳源和氮源代谢中起重要作用^[1,2]。地中海诺卡氏菌 U-32 是力复霉素 SV 的高产菌株。U-32 合成力复霉素 SV 的产量与氨浓度的调节有关。高氨时, ADH 活力高, SV 产量很低, 此时 ADH 是氨同化的主要酶^[3]; 相反, 低氨时, 当谷氨酰胺合成酶 (GS) 比活力高时, ADH 低, SV 产量则较高。有关 GS 酶对力复霉素 SV 的调节作用, 本实验室已有报导^[4,5]。本文主要报导地中海诺卡氏菌 L-丙氨酸脱氢酶的提取、纯化和性质研究。

材料和方法

(一) 菌种

地中海诺卡氏菌 U-32 (*Nocardia*

mediterranei)。由上海第三制药厂提供。

(二) 培养方法

将培养在本氏斜面培养基上的新鲜菌丝体接种到液体无机培养基中, 28℃ 转床培养 48 小时后, 按 10% 的接种量转接到无机发酵培养基中, 其成份为 (g/L): 葡萄糖 40, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, NaCl 1, CaCO_3 3; 微量盐溶液 1 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, CoCl_2 0.1%), pH 7.0, 氮源配方见各实验, 在 28℃ 旋转摇床上进行培养, 转床的旋转半径为 2.5cm, 转速 180r/min 培养 36 小时后补加 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 28℃ 继续培养 12 小时。

(三) 一般分析方法

1. 菌体生长的测定: 按干重称量法^[3]。

2. 蛋白质含量的测定: 按 Lowry 等

本文于 1989 年 3 月 23 日收到。

* 全国自然科学基金项目。

的方法^[5],以牛血清白蛋白为标准蛋白。

3. ADH 酶活力的测定: ADH 酶活力按 Aharonowitz 等方法^[7]。ADH 比活力单位为 30℃ 下,每毫克蛋白质每分钟催化 1 μmol NADH 的氧化。

(四) ADH 的分离纯化

参考 Itoh 与 Morikawa 分离纯化 *Streptomyces phaeochromogenes* ADH 的方法^[8]作了一些修改。所有纯化步骤均在 0—5℃ 之间操作。

1. 无细胞抽出液的制备: 地中海诺卡氏菌发酵培养 48 小时后,收集菌体,并洗涤。将菌体悬浮于缓冲液 A 中 (20 mmol/L pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液,内含 1 mmol/L 巯基乙醇和 1 mmol/L EDTA), 比例为 1g 湿菌体: 4.5ml 缓冲液,经 MSE 超声波破碎器 20 KC 处理 20 分钟,离心去除细胞碎片,得无细胞抽出液。

2. 40—50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀: 无细胞抽出液于冰浴中缓慢加入研细的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度 40%,调节 pH 为 7.0,于 4℃ 静置过夜,16000 r/min 离心,弃沉淀。向上清液中缓慢加入研细的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末,使上清液达饱和度 50%,调 pH 7.0,于 4℃ 静置过夜,17000r/min 离心收集沉淀。用缓冲液 B (20mmol/L pH8.0 Tris-HCl, 1 mmol/L 巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA) 溶解,对缓冲液 B 透析过夜,用 5% Ba(AC)₂ 溶液检验缓冲液直到无 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为止^[9]。

3. DEAE-纤维素 (DE 52) 柱层析: DE52 为 Whatman 公司的产品。柱体积为 $\phi 2.5 \times 20.0 \text{ cm}$,用缓冲液 B 平衡。将透析过夜的粗酶液缓慢上柱,流速为 60 ml/h。然后用缓冲液 B 充分洗涤,直到流出液在 280 nm 的吸收值低于 0.02,吸收值不继续下降后,被吸附的酶再用缓冲液 B 配制的 NaCl (0.2—0.4 mol/L) 线性梯

度洗脱。每 4ml 收集一管。将 ADH 活性部分合并后用饱和度 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀过夜,离心收集沉淀,将沉淀溶于适量的缓冲液 B 中,并对缓冲液 A 进行透析。

4. 亲和蓝柱层析: 亲和介质系 Pharmacia 公司的产品。柱体积为 $\phi 2.5 \times 20.0 \text{ cm}$,用缓冲液 A 平衡。将上一步透析好的酶液缓慢加到柱上,进入柱床后,静置 20 分钟,再用缓冲液 A 洗柱,流速 48ml/h。待柱中未吸附的蛋白质洗净后,再用缓冲液 A 配制的 0—0.5 mol/L KCl 线性梯度洗脱,每 5ml 一管,将 ADH 活性部分合并后,用 65% 的饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀,再用缓冲液 A 溶解,并对此缓冲液广泛透析以除 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

(五) 电泳分析

1. 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳按 Davis 方法^[10]进行。分离胶浓度为 7.5%。

2. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Weber 和 Osborn 方法^[11],分离胶浓度为 5%。

3. 聚丙烯酰胺梯度凝胶薄板电泳按 Rodbord 等方法^[12]稍有改动,形成 4—30% 凝胶梯度,室温下连续电泳 3000 伏特小时。

(六) 凝胶电泳图谱的扫描

使用 UV-190 双波长光度计,在 620nm 对凝胶条扫描。

结果和讨论

(一) 地中海诺卡氏菌 U-32 ADH 的生物合成

对 U-32 在不同的培养基中 ADH 酶活力水平进行了观察(表 1)。当 U-32 生长在含有 L-Ala、D-Ala 以及 NH_4^+ 的培养基中,ADH 的比活力显著提高,L-Ala 与 D-Ala 的影响相差不大。这与已报导的 *S. phaeochromogenes* 不同,此菌在含 1.0% L-Ala 的培养基中菌体 ADH 比活

力是在 D-Ala 培养基中的 2 倍^[8]。

表1 L-ALA 和 D-ALA 对 ADH 合成的影响

Table 1 Effect of L-and D-alanine on alanine dehydrogenase formation

添加物 Addition	浓度 Conc. (%)	ADH 比活力 Sp. act. (u/mg)
无 None	—	5.43
甘油 Glycerol	1.0	4.68
L-Ala	1.0	187.5
D-Ala	1.0	191.7
DL-Ala	1.0	227.9
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	115.2

图 1 显示了地中海诺卡氏菌 U-32 培养基中 NH₄⁺ 浓度对 U-32 的 pH、菌体生长、力复霉素 SV 的合成、ADH 活力的影响。ADH 在发酵前期 (12 小时) 比活力很高, 发酵后期 ADH 比活力很低; 在菌体生长 36 小时补加 0.5% (NH₄)₂SO₄ 后, ADH 在 48 小时达到最高水平, 随后酶活力水平又下降。48 小时时菌体的生成量已是 12 小时的 4 倍, 以此时的菌体为 ADH 分离纯化材料。

当氮源为 (NH₄)₂SO₄ (0.4%) 时, 发酵 36 小时后补加 0.5% (NH₄)₂SO₄ 对力

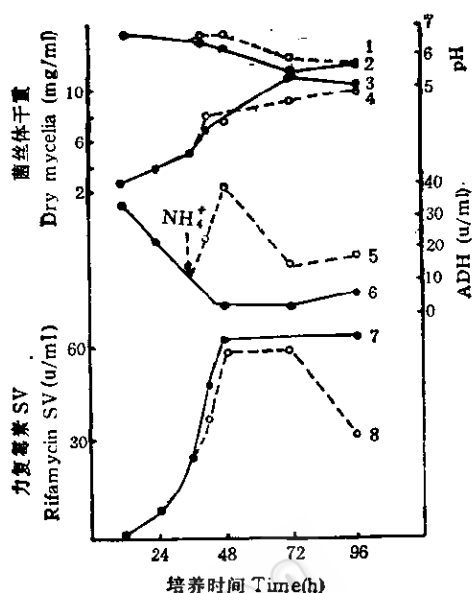


图 1 氨对 U-32 菌体生长、力复霉素 SV 合成和 ADH 活力的影响

Fig. 1 Effects of NH₄⁺ on mycelial growth, SV production and specific activity of ADH

1, 2, pH; 3, 4, 菌丝体干重 Dry weight of mycelia; 5, 6, ADH 比活力 Specific activity of ADH; 7, 8, 力复霉素 SV; —, 0.4% (NH₄)₂SO₄ in medium; --- After cultivation 36 h, add 0.5% (NH₄)₂SO₄ to medium

复霉素 SV 的生成无显著影响。这可能是 NH₄⁺ 对 SV 的生物合成的氨阻遏效应主要

表 2 地中海诺卡氏菌 U-32 ADH 的纯化

Table 2 Purification of ADH from *N. mediterranei* U-32

纯化步骤 Procedure	总蛋白质 Protein (mg)	总活力 Total act. (u)	比活力 Sp. act. (u/mg)	纯化倍数 Purification fold	回收率 Recovery (%)
细胞抽出血 Crude extract	1610	84916	52.7	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	216	31824	147.3	2.8	37.5
DE-52 DE-52 Chromatography	90	31430	348.7	6.6	37.0
Aff-Gel Blue	1.5	4251	2862.6	54.3	5.0

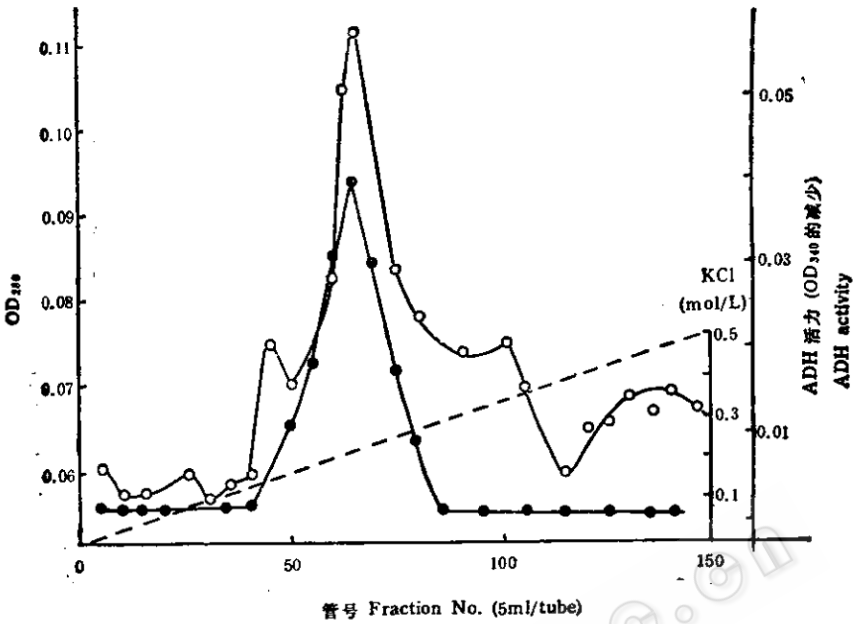


图2 地中海诺卡氏菌 ADH 经亲和和蓝柱流出图谱
Fig. 2 Blue-Sepharose CL-4B column chromatography of L-Alanine dehydrogenase from *N. mediterranei* U-32
○—○ Absorbance at 280nm; —●— Enzyme activity

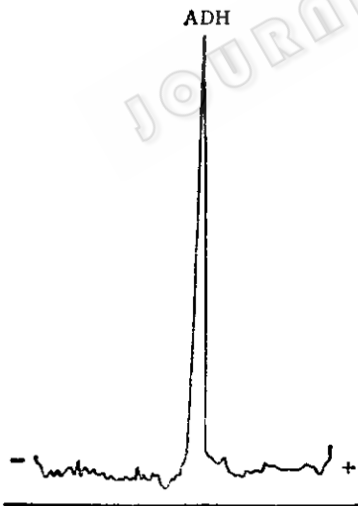


图3 ADH 圆盘聚丙烯酰胺凝胶电泳胶条于双波长光度计 UV-190 上扫描 (620 nm)
Fig. 3 Scanning of purified ADH in polyacrylamide gel



图4 地中海诺卡氏菌 U-32 ADH 结晶
Fig. 4 Photograph of L-alanine dehydrogenase crystals from *Nocardia mediterranei* U-32 (X 800)

种合成井冈霉素^[13]和 *Streptomyces clavuligerus* 合成头孢菌素^[14]的过程中也存在此种现象。

(二) ADH 的纯化

采用硫酸铵分部沉淀、DE 52 离子交

发生在发酵的前期。在吸水链霉菌井冈变

换柱层析以及亲和蓝柱层析分离纯化了地中海诺卡氏菌 U-32 ADH 54 倍 (图 2), 得到电泳纯一条带 (图 3)。分离纯化的结果见表 2。经过亲和蓝柱层析后的酶液于冰浴中缓缓加入硫酸铵粉末至饱和度为 60%, 搅拌, 置 4℃ 冰箱 5 天以上, 可以得到针状结晶。结晶后因晶体量少未能测其活力, 但因硫酸铵在 4℃ 下 65% 饱和度不可能结晶出来, 故可排除针状结晶是盐的结晶, 而只可能是酶 ADH 的结晶 (图 4)。已有文献报导, 枯草杆菌^[12]和球孢杆菌^[13] ADH 结晶的晶形均为针状。Itoh 等报导^[8] *S. phaeochromogenes* 的 ADH 结晶为长方形棒状。

(三) 地中海诺卡氏菌 ADH 的性质

1. 分子量和亚基分子量: ADH 经过

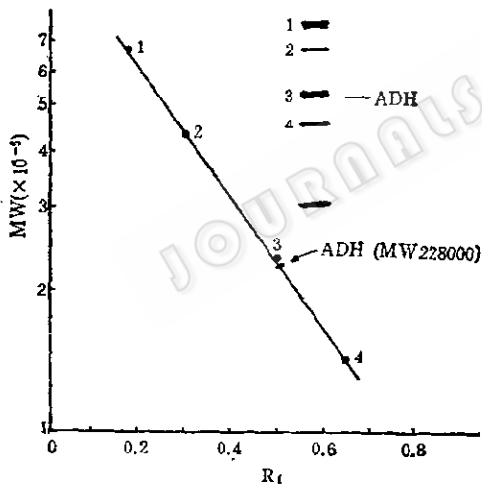


图 5 聚丙烯酰胺梯度电泳测 ADH 分子量

Fig. 5 Molecular weight of L-alanine dehydrogenase by gradient polyacrylamide gel electrophoresis

标准蛋白质的分子量

Molecular weight of standard proteins:

1. 甲状腺球蛋白 Thyroglobin (MW 669000);
2. 铁蛋白 Ferritin (MW 440000);
3. 过氧化氢酶 Catalase (MW 232000);
4. 乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase (MW 140000)

4—30% 聚丙烯酰胺胶电泳, 呈一条带。以蛋白质的分子量对数对各标准蛋白质的相对迁移率作图, 从标准曲线上查得 ADH 的分子量为 228000 道尔顿 (图 5)。

ADH 样品与标准蛋白质进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, ADH 也为一条带。以蛋白质亚基分子量的对数对各标准蛋白质的相对迁移率作图, 由标准曲线查出 ADH 的亚基分子量为 38000 道尔顿 (图 6)。

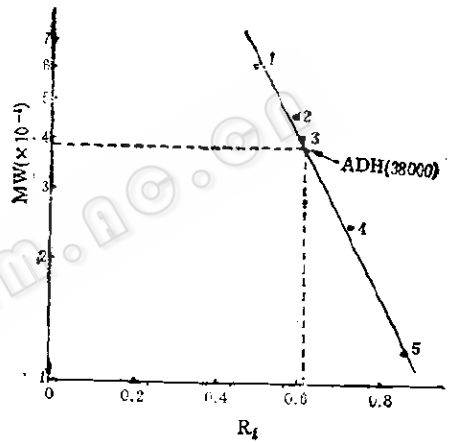


图 6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 ADH 的亚基分子量

Fig. 6 Subunit molecular weight of alanine dehydrogenase by SDS polyacrylamide disc gel electrophoresis

标准蛋白质分子量

The molecular weights of standard proteins are:

1. 过氧化氢酶 Catalase (subunit MW 60000);
2. 清蛋白 Albumin (native MW 45000);
3. 醛缩酶 Aldolase (subunit MW 40000);
4. 胰凝乳蛋白酶原 A Chymotrypsinogen A (MW 23000);
5. 细胞色素 C Cytochrome C (MW 12300)

由 ADH 的分子量和亚基分子量可推算出 ADH 有 6 个相同的亚基。据已有的文献报道, 不同来源的 ADH 大多为 6 个亚基, 少数为 4 个亚基, 个别的如红皮盐杆菌 *Halobacterium cutribrium*^[17], *Strep.*

omyces clavuligerus^[7] 仅有一条肽链。

2. 地中海诺卡氏菌 U-32 ADH 的动力学: 地中海诺卡氏菌 ADH 的催化作用具有重要的生理作用, 因此研究 ADH 的动力学性质是很有意义。

表 3 地中海诺卡氏菌 U-32 的 ADH
对不同底物的 K_m 值

Table 3 K_m Values for various substrates
of ADH

底 物 Substrate	pH	米氏常数 K_m (mol/L)
丙酮酸 Pyruvate	11.0	4.88×10^{-4}
NH_4^+	11.0	4.03×10^{-3}
NADH	11.0	6.02×10^{-3}
L-Ala	8.0	7.45×10^{-3}
NAD ⁺	8.0	6.67×10^{-3}

ADH 对不同底物的表观米氏常数 K_m 可根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图计算, ADH 对丙酮酸、 NH_4^+ 、NADH、L-Ala 和 NAD⁺ 的 K_m 见表 3。

Hill 作图呈一条直线, Hill 系数 n 对不同的底物不尽相同, 对丙酮酸、NADH 和 NAD⁺, 其 n 值均为 1; 对 L-Ala、 NH_4^+ , 其 n 值分别为 0.51 和 0.52 (图略)。显然 ADH 对 L-Ala、 NH_4^+ 均有负协同效应。由此可以推测 ADH 是调节酶。

3. pH 对地中海诺卡氏菌 U-32 ADH 活力的影响: ADH 催化脱氨基反应的最适 pH 为 11.5, 而催化还原氨基化反应的最适 pH 为 8.5, 酶的稳定性范围在 pH 7.5—11.5, 在已报道的不同微生物中 ADH 的最适 pH 均偏碱。

4. 温度对地中海诺卡氏菌 U-32 ADH 活力的影响: U-32 的 ADH 在 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液中 (pH 8.3), 在不同温度下保温 20 分钟, 迅速放置冰水中, 再按还原氨基化反应测定, 酶的残留率分别为: 45℃ 时 78%, 50℃ 时 78%, 55℃ 时 68%, 60℃ 时 35%。显然, U-32 的 ADH 在 45—50℃ 间有最高活力。

参 考 文 献

- [1] Hanson, R. S. and E. L. Campbell: Spores IV p. 196—211, American Society for Microbiology, Bethesda, Md., 1969.
- [2] Aharonowitz, Y. et al.: *J. Microbiol.*, 25: 61—67, 1979.
- [3] 倪楠英等: 微生物学报, 24(3): 217—223, 1984.
- [4] 梅百根等: 生物化学生物物理学报, 18: 491—499, 1986.
- [5] 梅百根等: 生物化学生物物理学报, 18: 500—511, 1986.
- [6] Lowry, D. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
- [7] Aharonowitz, Y. et al.: *Arch. Microbiol.*, 125: 137—142, 1980.
- [8] Itoh, N. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 47(11): 2511—2519, 1983.
- [9] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 第 195—200 页, 高等教育出版社, 北京, 1987 年。
- [10] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404—427, 1964.
- [11] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 244: 4406—4417, 1969.
- [12] Rodborn, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 40: 135—157, 1971.
- [13] 夏天辉, 焦瑞身: 抗生素, 11(5): 439—443, 1986.
- [14] Aharonowitz, Y.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 34: 209—233, 1980.
- [15] Yoshida, A. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 92: 33—43, 1964.
- [16] Ohashima, T. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 100: 29—39, 1979.
- [17] Kim, E.K. et al.: *Biochem. J.*, 161: 313—320, 1977.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF L-ALANINE DEHYDROGENASE FROM *NOCARDIA* *MEDITERRANEI*

Diao Rong Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

L-Alanine Dehydrogenase (L-Alanine: NAD oxidoreductase, deaminating, EC 1.4.1.1) was purified to homogeneity from a cell-free extract of *Nocardia mediterranei* U-32 by precipitation with ammonium sulfate and column chromatography on DEAE-cellulose, Blue-Sepharose. By electrophoresis with polyacrylamide and SDS-polyacrylamide gel, it was demonstrated that the molecular weight of ADH was 228000 and it was composed of six identical subunits with a molecular weight of 38000. The enzyme is stable in a wide pH range (pH 7.5—11.5), and the optimal pH is 11.5 for the deamination and 8.5 for the amination. The optimal temperature of deamination is 50°C. The Michaelis constants of ADH are as follows:

Pyrurate 4.88×10^{-4} mol/L;
 NH_4^+ 4.03×10^{-3} mol/L;
NADH 6.02×10^{-5} mol/L;
 NAD^+ 6.67×10^{-5} mol/L;
L-Alanine 7.45×10^{-3} mol/L.

The hill constants of ADH are as follows:

Pyrurate (n, 1); NADH (n, 1);
NAD (n, 1); L-Ala (n, 0.52); NH_4^+ (n, 0.51).

We suggest that ADH could be an allosteric enzyme.

Key words

L-Alanine Dehydrogenase; *Nocardia mediterranei* U-32; Purification and Properties