

头状轮生链霉菌谷氨酰胺合成酶的研究

I. 酶的生成和纯化

崔凤文 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘 要 以氨为氮源培养头状轮生链霉菌(*Streptovorticillium caespitosus*)时粗抽提液中谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)对热稳定,以硝酸盐为氮源时 GS 对热不稳定。以硫酸链霉素沉淀、热处理、聚乙烯亚胺(PEI)沉淀和 Affini-gel Blue 柱纯化了前者,以 DE-52 柱和 Affini-gel Blue 柱纯化了后者,纯化后两个酶分子量同为 550000,亚基分子量同为 56000,热稳定性相同,转谷氨酰基酶活力的最适 pH 均在 6.4~6.7 之间,对谷氨酰胺的 K_m 值同为 11.1mmol/L,对羟胺的 K_m 值同为 1.6mmol/L,所以认为此菌中总是同一 GS 表现出活力。

关键词 头状轮生链霉菌,谷氨酰胺合成酶,同工酶

谷氨酰胺不仅是合成蛋白的原料,也是许多含氮化合物的氮供体^[1]。GS(谷氨酸:氨连接酶,EC6.3.1.2)主要催化谷氨酰胺的合成,所以为氮代谢中的关键酶。目前发现 GS 至少有三种形式^[2],三者亚基的分子量及数目都不相同^[3]。GSI 存在于肠道菌等多种细菌中^[4],根瘤菌和 *Frankia* 菌中除 GSI 外存在另一个同工酶 GSII^[5],GSIII 则为厌氧的 *Bacteroides* spp.所独有^[3]。

链霉菌(如 *Streptomyces cattleya*^[8]等)的 GS 一直认为属 GSI 型,但是近来在吸水链霉菌和 *Streptomyces viridochromogenes* 中克隆到编码 GSII 型 GS 的 DNA 顺序,并推论 GSII 是诱导型的,于形成孢子、产抗生素或营养贫乏时表达^[2,7],但是迄今未见有关 GSII 的生化方面的证据^[8]。Hillemann 等^[9]从 *S.viridochromogenes* 同时克隆了 GSI 和 GSII 基因,并表明 GlnA⁻或 GlnII⁻都不需要谷氨酰胺就能生长,GSI 和 GSII 总是同时表达,GSI 提供主要的活力。

本文从生化方面研究了头状轮生链霉菌中 GS 是否有同工酶及其在代谢中所起的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂

PEI 和 Affini-gel Blue 为 Amicon 公司产品, Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品,标准蛋白为 Serva 公司产品,其他药品均为试剂级。

1.2 菌种和培养基

1.2.1 菌种:头状轮生链霉菌 ATCC27422 是丝裂霉素产生菌,培养温度为 28℃。

1.2.2 培养基 1: 种子培养基(%)，葡萄糖 1，蛋白胨 1， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05， $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1， NaCl 0.2，麦芽糖 1，黄豆粉(沸水抽提液) 1.5，pH7.5。

1.2.3 培养基 2(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 0.3，氮源见各实验，微量元素液 1ml($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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%)，pH7.5。

1.3 方法

1.3.1 培养方法: 一般每 50ml 培养基 1 接种一环孢子和菌丝体或 0.1ml 孢子悬液，在转动半径 2.5cm，转速 180r/min 的转床上培养 48h。按 10% 的接种量接种种子液至培养基 2，在同上的转床上培养，抽滤收集菌体，蒸馏水洗涤， -20°C 保存。

1.3.2 无细胞抽提液的制备: 取湿菌体，加入 5~10 倍含 1mmol/L MnCl_2 ，pH7 的 50mmol/L 咪唑缓冲液，冰浴中超声破碎，于 4°C 以 12000r/min 离心 10min，上清即为无细胞抽提液。文中提到的缓冲液均为此缓冲液，有添加物的特别指出。

1.3.3 GS 转谷氨酰胺酶活(GS_T): 按 Bender 等^[10] 的方法，于 pH6.7 测定。一个酶活单位(U)定为每分钟催化产生 $1\mu\text{mol}$ 谷氨酰异羟基肟酸所需的酶量。

1.3.4 蛋白质测定: Bradford^[11] 法。

1.3.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 按张龙翔等^[12] 的方法，SDS 电泳胶浓度为 10%，梯度胶电泳胶浓度为 4~30%。

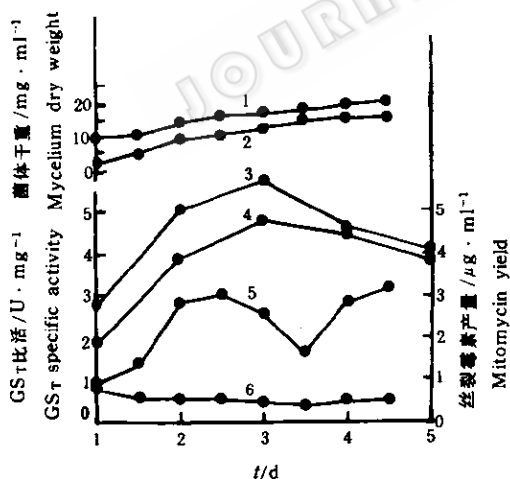
2 结果和讨论

2.1 头状轮生链霉菌生长过程中 GS_T 活力的表现(图 1)

图 1 头状轮生链霉菌培养过程中 GS_T 活力表现

Fig.1 GS_T activity in the cultivation course

1. 菌体干重[用 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培养]
Mycelium dry weight(0.8% ammonium sulfate);
2. 菌体干重[用 0.3% KNO_3 培养]
Mycelium dry weight (0.3% nitrate);
3. 丝裂霉素产量[用 0.3% KNO_3 培养]
Mitomycin yield (0.3% nitrate);
4. 丝裂霉素产量[用 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培养]
Mitomycin yield (0.8% ammonium sulfate);
5. GS_T 比活力[用 0.3% KNO_3 培养]
 GS_T specific activity (0.3% nitrate);
6. GS_T 比活力[用 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培养]
 GS_T specific activity (0.8% ammonium sulfate).



由图 1 可见，在含 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (较常量加倍)为唯一氮源的培养基中，GS 的比活随时间呈逐步下降的趋势。此培养基上生长 1d 的菌体处于氮源丰富条件下的初生代谢时期，收集菌体制成粗酶液，于 60°C 水浴中放置 15min，酶活不变(图 2)。图 1 还可见在含 0.3% KNO_3 (较常量减半)为唯一氮源的培养基中 GS 的比活明显地分为两个峰区。此培养

基上生长 4.5d 的菌体处于氮源贫乏条件下的次生代谢时期, 收集菌体制成粗酶液, 同上热处理, 酶活力迅速丧失(图 2)。在同时具有 GS I 和 GS II 的根瘤菌和 *Frankia*^[5] 等菌中, 两种类型的酶对热的敏感性与此类似。我们分别纯化这两种条件下的 GS 以作进一步的研究。为方便起见, 文中称粗酶液中对热处理稳定的 GS 为 GSs, 不稳定的为 GSu。

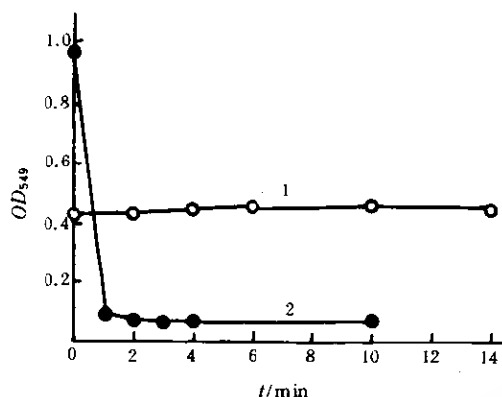


图 2 粗酶液中 GS 的热稳定性

Fig.2 Heat stability of GS in crude extracts

1. 用 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培养 0.8% ammonium sulfate; 2. 用 0.3% KNO_3 培养 0.3% nitrate.

2.2 GSs 的提取

取 10g 湿菌体制成无细胞抽提液, 下面的步骤除指出外均在 4℃ 条件下进行, 离心均为 12000r/min, 20min。向无细胞抽提液中缓慢滴加新鲜配制的 20% 硫酸链霉素至终浓度为 0.8%, 搅拌 20min, 离心, 取上清液, 在 60℃ 处理 5min 后冷却至 4℃, 离心, 取上清液, 缓慢加入 PEI (2.15%, pH7) 至终浓度为 0.15%, 搅拌 20min, 离心, 取沉淀并溶解在含 1mol/L NaCl 的缓冲液中, 上 Affini-gel Blue 柱 (柱体积 1×10cm, 预先以含 1mol/L NaCl 的缓冲液平衡), 先以平衡缓冲液洗至 OD_{280} 不再下降, 再用含 5mmol/L ADP 的平衡缓冲液洗脱, 合并 GS 酶活高的部分, 对缓冲液透析后得到电泳纯的 GSs, 有关数据见表 1 及图 3。

2.3 GSu 的提取

取 5g 湿菌体制成无细胞抽提液, 以下操作均在 4℃ 条件下进行, 离心均为 12000r/min, 20min。首先以 DE-52 和 Sepharose 4B 柱纯化 GSu, 发现操作过程中酶活损失严重, 过 DE-52 柱后酶活得率为 19.6%, 再过 Sepharose 4B 柱得率为 9.65%。试验了几种保护措施, 发现在粗酶液中加入 200mmol/L NaCl 可使 GSu 稳定, 于是将提纯方法改变如下。在缓冲液中加入 200mmol/L NaCl 以稳定 GSu, 上 DE-52 柱 (柱体积为 2×25cm, 预先以含 200mmol/L NaCl 的缓冲液平衡), 先以 100ml 平衡液洗, 再以 300ml 含 200~500mmol/L NaCl 的缓冲液洗脱, 只有单一的酶活峰, 合并酶活高的部分, 上 Affini-gel Blue 柱 (柱体积 1×10cm, 预先以含 200mmol/L NaCl 的缓冲液平衡), 以含 1mol/L NaCl 的缓冲液洗, 接着以含 5mmol/L ADP, 1mol/L NaCl 的缓冲液洗脱, 合并酶活高的部分, 对含 200mmol/L NaCl 的缓冲液透析后得到电泳纯的

GSu, 有关数据见表 2 和图 3。

表 1 GSs 的纯化(GS_T, Mn²⁺)
Table 1 Purification of GSs (GS_T, Mn²⁺)

步 骤 Step	体积 Volume V / ml	总蛋白 Total activity / mg	总活力 Total activity / u	比活 Specific activity / u · mg ⁻¹	纯化倍数 Purification fold	得率 Recovery / (%)
粗提液 Crude extracts	53.5	511.8	432	0.86	1	100
硫酸链霉素沉淀 Streptomycin sulfate precipitation	53.5	463.7	615	1.33	1.54	142.4
热处理 Heat treatment	50.1	228	501	2.2	2.55	115.9
PEI 沉淀 PEI precipitation	5	89	362	4.07	4.74	83.9
Affini-gel Blue	3.6	1.17	137	117	136.5	31.8

表 2 GSu 的纯化(GS_T, Mn²⁺)
Table 2 Purification of GSu (GS_T, Mn²⁺)

步骤 Step	体积 Volume V / ml	总蛋白 Total activity / mg	总活力 Total activity / u	比活 Specific activity / u · mg ⁻¹	纯化倍数 Purification fold	得率 Recovery / (%)
粗提液 Crude extracts	12.7	200	332.3	1.7	1	100
DE-52	39.6	15.3	202.2	13.2	7.96	60.8
Affini-gel Blue	4	1.29	120.3	93.5	56.3	36.2

GSu 经稳定后的提纯过程中每步均只有单一酶活峰, 过每个柱后酶活的回收率都很高。而由图 2 可见, 不加以稳定时 GSu90%以上的酶活可被热失活, 所以不可能是 GSu 之外的其他 GS 被提取出来。

2.4 头状轮生链霉菌中没有 GS 同工酶

2.4.1 GSs 和 GSu 的 pH 曲线相同: GSs 和 GSu 的 GS_T 最适 pH 均在 6.4~6.7 之间, 两个 pH 曲线形状也相同。

2.4.2 GSs 和 GSu 的全酶和亚基分子量相同: GSs 和 GSu 的 SDS 和梯度凝胶电泳结果 (图 3) 表明两个酶的整酶和亚基的分子量完全一样, 分别为 550 000 和 56 000。

2.4.3 GSs 和 GSu 的动力学常数相同: 二者对谷氨酰胺的表观 K_m 值为 11.1mmol / L, 对羟胺的表观 K_m 值为 1.6mmol / L。

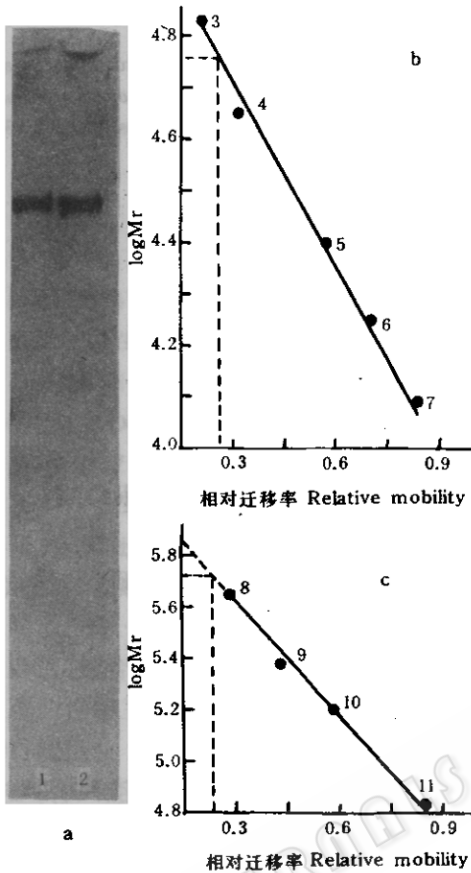


图3 GSs 和 GSu 的电泳图和分子量测定

Fig.3 The electrophoresis pattern and molecular weight determination of GSs and GSU

a.SDS 电泳 SDS electrophoresis;

b.SDS 电泳测亚基分子量 Determination of subunit molecular weight by SDS electrophoresis;

c.梯度胶电泳测全酶分子量 Determination of the molecular weight of native enzyme by pore gradient electrophoresis;

1.GSs;2.GSu;3.Albumin, bovine serum(67000);

4.Albumin,egg(45000);

5.Chymotrypsinogen(25000);

6.Myoglobin, horse(17800);

7.Cytochrome C;

8.Ferritin, horse spleen(450000);

9.Catalase, bovine(240000);

10.Aldolase, rabbit muscle(160000);

11.Albumin, bovine serum(670000).

2.4.4 纯酶状态下 GSs 和 GSu 的热稳定性相同:将纯化的 GSs 和 GSu 处于相同的不含 NaCl 的缓冲液中试验热稳定性,结果如图 4。可见两者在 60℃ 时酶活下降的趋势和幅度是一样的,两个酶在粗液状态下的不一致可能由细胞环境造成,而二者是同一酶。透析去掉粗液中的小分子物质也不能改变这种现象。GSu 粗酶液中加入 2mmol/L 苯甲基磺酰氟,于 4℃ 放置 36h 后酶活仍可保持 64%,所以可能是营养贫乏时菌体有些自溶,蛋白酶活力较高引起 GS 失活。

综合以上实验结果可以认为在头状轮生链霉菌中无论是初生代谢还是次生代谢,氮源丰富还是贫乏均是 GSI 型的 GS 表现出活力。

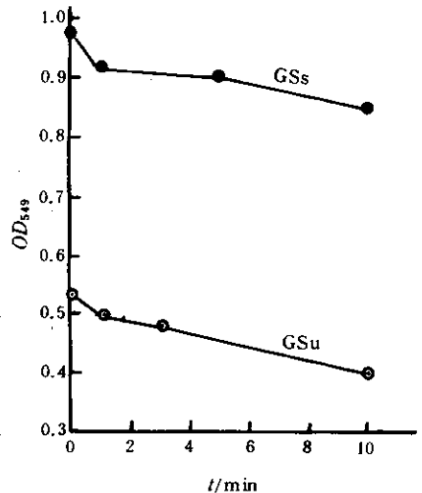


图4 纯化后 GSs 和 GSu 对热的稳定性
Fig.4 Stability of GSs and GSu to heat treatment after purification

参 考 文 献

- [1] Wolheuter R M, Schutt H, Holzer H. Regulation of glutamine synthetase *in vivo* in *E. coli*. In: Prusiner S. et al. ed. The Enzymes of Glutamine Metabolism. New York: Academic Press, 1973. 45~66.

- [2] Kumada Y, Takano E, Nagaoka K *et al.* *J Bacteriol*, 1990, **172**: 5343~5351.
- [3] Hill R T, Parker J R, Goodman H J K *et al.* *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 3271~3279.
- [4] Reitzer L J, Magasanik B. Ammonium assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. In: Nerdhart F C *et al.* ed. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. Washington D C: American Society for Microbiology Press, 1987. 302~320.
- [5] Edmonds J, Noridge N A, Benson D R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 6126~6130.
- [6] Streicher S L, Tyler B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 229~233.
- [7] Behrmann I, Hillemann D, Puhler A *et al.* *J Bacteriol*, 1990, **172**: 5326~5334.
- [8] Fisher S H. *Gene*, 1992, **115**: 13~17.
- [9] Hillemann D, Dammann T, Hillemann A *et al.* *J Gen Microbiol*, 1993, **139**: 1773~1783.
- [10] Bender R A, Jassen K A, Resnick A D *et al.* *J Bacteriol*, 1977, **129**: 1001~1009.
- [11] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~254.
- [12] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验技术和方法. 北京: 高等教育出版社, 1981. 112~124.

STUDIES ON GLUTAMINE SYNTHETASE FROM *STREPTOVERTICILLIUM CAESPITOSUS*

I. EXPRESSION AND PURIFICATION OF THE ENZYME

Cui Fengwen Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology Academia Sinica Shanghai 200032)

Abstract When ammonium was used as nitrogen source in the cultivation of *Str. caespitosus*, glutamine synthetase (GS) in crude extract was stable to heat treatment, while GS from nitrate cultivation was thermal labile. The former was purified by streptomycin sulfate precipitation, heat treatment, PEI precipitation and Affini-gel Blue chromatography and latter was purified by DE-52 and Affini-gel Blue chromatography. After purification, the two GS preparations showed the same molecular weight of 550000 and subunit weight of 56000. They also exhibited the same thermal stability and optimum pH of 6.4~6.7. Their K_m values for glutamine and hydroxylamine-hydrochloride were the same. Based upon these experimental evidences it was considered that only one kind of GS was present in this bacterium.

Key words *Streptovorticillium caespitosus*, Glutamine synthetase, Isoenzyme