

## 林肯链霉菌谷氨酰胺合成酶的酶学性质\*

金 耆\*\* 杨蕴刘 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

**摘 要** 在分离纯化的基础上,报道了 pH、温度和金属离子对林肯链霉菌 (*Streptomyces lincolnensis*) Z-512 谷氨酰胺合成酶 (GS) 活力的影响及 GS 底物专一性的研究结果。在动力学性质的研究中,发现林肯链霉菌 GS 在生物合成反应系统中,对底物  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的饱和曲线不遵守米氏方程。Hill 作图呈两相曲线。在  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度低的情况下, Hill 系数大于 1, 具有正协同效应; 当  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度增加到一定程度时, Hill 系数小于 1, 具有负协同效应。这说明  $\text{NH}_4\text{Cl}$  不仅作为林肯链霉菌 GS 的底物, 而且作为一种效应物调节 GS 的活性。林肯链霉菌 GS 对底物 Glu 及 ATP 的饱和曲线遵守米氏方程。在不同的激活离子存在下, GS 对 Glu、ATP 的  $K_m$  值也不同。

**关键词** 林肯链霉菌, 谷氨酰胺合成酶, 酶学性质

**分类号** Q559

大部分抗生素分子中均含有氮, 而 60% 以上的抗生素是由链霉菌产生的。因此, 研究链霉菌的氮同化和氮代谢的调控具有十分重要的理论和实践意义。

我们在林肯链霉菌氮同化途径的研究中, 发现氮的同化主要经丙氨酸脱氢酶 (ADH) 途径和谷氨酰胺合成酶 (GS) / 谷氨酸合酶 (Glutamate synthase) 途径<sup>1)</sup>。谷氨酰胺合成酶是氮同化途径中一个重要的酶, 它同谷氨酸合酶偶联, 共同完成同化氮的过程。该酶的催化作用具有重要的生理功能, 研究其酶学性质是很有意义的, 因此许多实验室对不同生物的 GS 进行了广泛研究<sup>[1, 2]</sup>。本文在分离纯化的基础上, 系统地研究了林肯链霉菌 GS 的酶学性质。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

林肯链霉菌 (*Streptomyces lincolnensis*) Z-512, 为华东理工大学惠赠, 经中国科学院上海植物生理研究所微生物室多次诱变获得的林可霉素高产菌株。

### 1.2 培养基、培养条件、主要仪器及电泳方法

参照文献 [3], 28℃ 发酵 108h。

### 1.3 酶缓冲液

咪唑-HCl 缓冲液: 咪唑 50mmol / L,  $\text{MnCl}_2$  1mmol / L, pH 7.2。

\* 本研究得到国家“863”计划、国家自然科学基金资助。

\*\* 现在南京大学生物化学系医药生物技术国家重点实验室做博士后 (210093)。

收稿日期: 1997-07-25

## 1.4 无细胞抽提液的制备

发酵 108h, 过滤收集菌体, 洗涤 2 次。50g 湿菌体悬浮于 400ml 缓冲液中。冰浴中, 超声波处理 30min。4℃ 18000r/min 离心 30min。弃去沉淀, 上清部分为无细胞抽提液。

## 1.5 蛋白质测定

参考 Bradford 方法<sup>[4]</sup>, 以牛血清白蛋白为标准。

## 1.6 酶活力测定

**1.6.1 GS 转谷酰基活性:** 采用 Bender<sup>[2]</sup> 的方法, 略有改动。反应液中含 135mmol/L 咪唑, 18mmol/L 羟胺, 0.27mmol/L  $MnCl_2$ , 25mmol/L 磷酸钾, 0.36mmol/L ADP 钠盐, pH7.0。取上述反应液 0.4ml, 加 0.05ml 适当浓度酶液, 于 37℃ 预热 5min, 加入 0.05mL L-Gln(终浓度 20mmol/L), 37℃ 保温反应 10min; 加入 1ml 反应终止液(1000ml 中含 55g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 20g 三氯乙酸, 21ml 浓 HCl) 终止反应, 离心去掉蛋白, 于 540nm 处比色, 以不含磷酸钾和 ADP 的反应做空白对照。在此条件下, 1 $\mu$ mol 谷氨酰异羟肟酸显色后的

$OD_{540} = 0.532$ 。一个酶活单位定义为每分钟催化产生 1 $\mu$ mol 谷氨酰异羟肟酸的酶量。比活力为:  $\mu$ /mg 蛋白。

**1.6.2 GS 生物合成活力:** 参照 Stadtman 等的方法<sup>[5]</sup>。每分钟催化产生 1 $\mu$ mol 无机磷的酶量为一个酶活单位。比活力:  $\mu$ /mg 蛋白。

## 1.7 谷氨酰胺合成酶的分离纯化

纯化过程所有操作均在 0~4℃ 条件下进行, 离心速度 18 000r/min, 时间为 30min。

**1.7.1 硫酸铵分级沉淀:** 向无细胞抽提液中加入  $(NH_4)_2SO_4$ , 离心收集 50%~70% 饱和度的沉淀部分, 溶于少量缓冲液中, 透析过夜。

**1.7.2 DEAE-52 柱层析:** 柱体积为  $2.5 \times 30$ cm, 用含 0~1.0mol/L NaCl 的缓冲液线性梯度洗脱, 分部收集。作蛋白浓度和 GS 活力测定, 合并酶活性部分, 浓缩、透析。

**1.7.3 Sepharose 6B 柱层析:** 柱体积为  $2.5 \times 90$ cm, 用缓冲液洗脱, 分部收集, 合并酶活性部分, 超滤浓缩至 5ml。

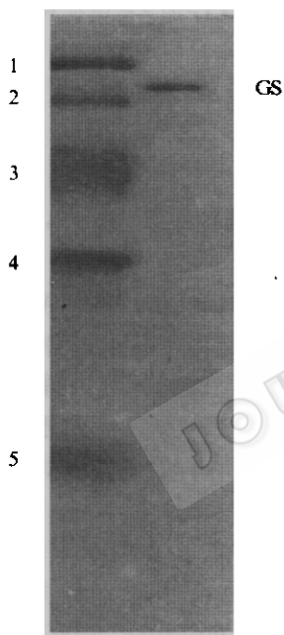


图 1 GS 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of GS

Molecular mass standard:

1. Thyroglobulin (669 000);
2. Ferritin (440 000);
3. Catalase (232 000);
4. Lactate Dehydrogenase (140 000);
5. Albumin (67 000).

## 2 结果和讨论

### 2.1 GS 的分离纯化

经过硫酸铵分级沉淀、DEAE-52 离子交换层析、Sepharose 6B 凝胶过滤三步, 得到了纯化的 GS(图 1)。酶提纯的典型过程总结于表 1 中。

在硫酸铵分级沉淀和离子交换层析过程中, 我们发现高离子强度对 GS 酶活有明显的抑制作用, 当通过透析除去高浓度盐离子后, GS 活力又得到了恢复。

表1 林肯链霉菌Z-512 GS 的分离纯化  
Table 1 Purification of glutamine synthetase from *S. lincolnensis* Z-512

步 骤	总体积	蛋白总量	比活力	总活力	回收率	提纯倍数
Purification step	Total volume	Total protein	Sp. act.	Total activity	Recovery	Purification
	(ml)	(mg)	(u/mg)	(u)	(%)	(fold)
无细胞抽提液	380	419.5	3.36	1410	100	1
Crude extract						
硫酸铵分级沉淀	80	86.4	10.42	900	63.8	3.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation						
DEAE-C52柱层析	20	7.4	60.70	449	31.9	18.1
DE-52 chromatography						
Sepharose 6B chromatography	5	0.9	149.1	134	9.5	44.4

2.2 酶的稳定性

林肯链霉菌的GS相当稳定,60℃保温10min,活力保持不变;室温放置1d,活力基本不变;4℃条件下,保存30d,活力仍保留90%以上。

2.3 pH对林肯链霉菌GS活力的影响

GS生物合成活力( $GS_b$ )是GS酶在生物体内的生理性催化反应, $GS$ 转谷酰基活性( $GS_t$ )是在体外检测和研究GS的重要反应,所以研究这两个反应的一些性质是必要的。图2为pH值对 $GS_b$ 和 $GS_t$ 比活力的影响情况。在转谷酰基活性分析系统中, $GS_t$ 的最适pH值为7.0,且各种氮源培养条件下得到的GS的pH曲线都相同。*E. coli*的GS由于腺苷化程度不同,其转谷酰基活性在某一pH处有相同的活性,这一pH值称为等活性点(isoactivity point)<sup>[6]</sup>。在林肯链霉菌GS中不存在等活性点。在生物合成分析系统中,金属激活离子不同,pH对GS活力的影响也不同:二价离子为 $Mg^{2+}$ 时, $GS_b$ 的最适pH值为7.2;而二价离子为 $Mn^{2+}$ 时, $GS_b$ 的最适pH为6.8。从图上还可以看到, $GS_t$ 活力对pH变化呈“钟形”;而 $GS_b$ 对pH的变化比较独特,在最适pH值以下, $GS_b$ 对pH的变化很敏感,但高于最适pH值时, $GS_b$ 变化较迟钝,pH值高达8.8时,比活力仍能保持50%左右,说明酶的 $GS_b$ 活力对碱性环境有一定的抗性。这与林肯链霉菌生长过程中嗜碱、发酵液pH偏高相吻合<sup>[7]</sup>。

2.4 林肯链霉菌谷氨酰胺合成酶的最适温度

林肯链霉菌GS转谷酰基活性的最适温度为50℃;GS生物合成活性的最适温度因金属激活离子不同而略有差异,以 $Mg^{2+}$ 作激活离子时,最适温度为36℃;而以 $Mn^{2+}$ 作激活离子时,最适温

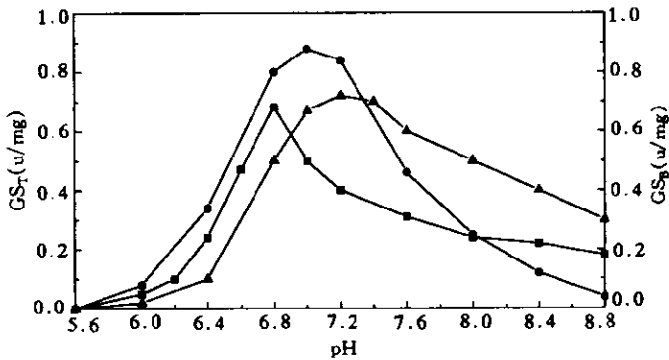


图2 pH对林肯链霉菌GS活力的影响  
Fig.2 Effects of pH on specific activity of glutamine synthetase from *Streptomyces lincolnensis*  
●—●  $GS_t$ ; ▲—▲  $GS_b$   $Mg^{2+}$ ; ■—■  $GS_b$   $Mn^{2+}$

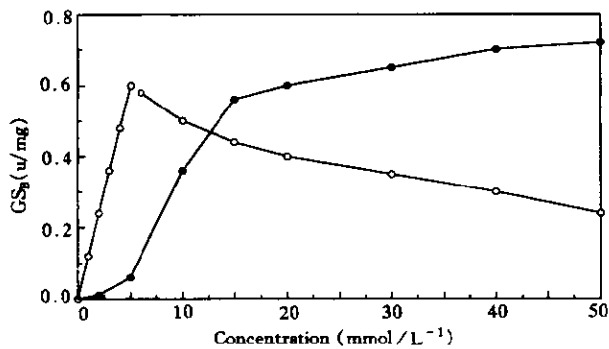


图3  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  对  $GS_B$  的影响  
Fig.3 Effects of  $Mg^{2+}$  &  $Mn^{2+}$  on glutamine synthetase biosynthetic activity  
●—●  $Mg^{2+}$  ; ○—○  $Mn^{2+}$  .

速增加,  $Mn^{2+}$  5mmol / L 时活力最高, 随后活力逐渐下降。随着  $Mg^{2+}$  浓度的增大,  $GS_B$  逐渐增高。此现象同谷氨酸微生物<sup>[9,10]</sup>和吸水链霉菌的 GS 很相似<sup>[11]</sup>。

同时还观察了另外几种金属离子,  $Ca^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  对  $GS_B$  的作用, 发现在相同浓度下, 它们均没有  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  作用明显, 见表 2。

表2 各种金属离子对  $GS_B$  的作用  
Table 2 Effects of metal ions on glutamine synthetase biosynthetic activity

金属离子 Metal ions (50mmol/L)	$Mg^{2+}$	$Mn^{2+}$	$Ca^{2+}$	$Co^{2+}$	$Fe^{3+}$
$GS_B$ (u)	0.731	0.516	0.214	0.036	0.024
相对活力 Relative activity (%)	100	70.6	29.3	4.9	3.3

2.5.2  $Mn^{2+}$  对 GS 具有稳定作用: 向 GS 酶液(缓冲液中含 1mmol / L  $MnCl_2$ ) 中加入不同浓度的金属离子螯合剂 EDTA, 置 60℃ 水浴中保温 30min, 观察 GS 活力损失情况, 结果

表3  $Mn^{2+}$  对 GS 热稳定性的影响  
Table 3 Effects of  $Mn^{2+}$  on glutamine synthetase stability

$MnCl_2$ 浓度 Concentration of $Mn^{2+}$ (mmol/L)	EDTA 浓度 Concentration of EDTA (mmol/L)	60℃ 保温 30min 后 GS 残存活力 Remaining activity of GS (%)
1	0.	100
1	2.5	60
1	5.0	12
1	10.0	6
10	2.5	100
20	5.0	96
40	10.0	90

度为 30℃。  
2.5 金属离子对林肯链霉菌谷氨酰胺合成酶活力的影响  
2.5.1 酶活测定系统中必需有金属离子: 生物体内许多金属离子参与酶活力的调节。大肠杆菌 GS 活力受二价金属离子的调节<sup>[6]</sup>, 而且金属离子, 特别是  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  对 GS 的稳定性和催化活性是必需的<sup>[8]</sup>。图 3 为不同浓度  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  对林肯链霉菌  $GS_B$  的影响。不存在金属离子时,  $GS_B$  完全无活力, 随着  $Mn^{2+}$  浓度的增大,  $GS_B$  迅速增加,  $Mn^{2+}$  5mmol / L 时活力最高, 随后活力逐渐下降。随着  $Mg^{2+}$  浓度的增大,  $GS_B$  逐渐增高。此现象同谷氨酸微生物<sup>[9,10]</sup>和吸水链霉菌的 GS 很相似<sup>[11]</sup>。

见表 3。在林肯链霉菌中,二价金属离子(如  $Mn^{2+}$ )不仅可以调节 GS 的活力,为 GS 催化活性所必需,而且对 GS 的稳定性也是必需的。GS 对热稳定的构象要靠金属离子(如  $Mn^{2+}$ )来支持。

2.5.3 一些金属离子对 GS 活力的抑制: 林肯链霉菌 GS 需要  $Mn^{2+}$  或  $Mg^{2+}$  激活,而其它金属离子对 GS 活力有不同的抑制作用(表 4)。其中  $Ba^{2+}$  离子抑制作用最强, $Fe^{3+}$  的抑制作用较  $Fe^{2+}$  的强,而  $Co^{2+}$  对 GS 活力的影响不大。

表4 金属离子对林肯链霉菌GS生物合成活力的抑制

Table 4 Inhibition of metal ions on glutamine synthetase biosynthetic activity

金属离子 Metal ions	残留活力 Remaining activity (%)	
	$Mn^{2+}$ as cofactor	$Mg^{2+}$ as cofactor
$FeSO_4$	30	12
$FeCl_3$	9	0
$CoCl_2$	96	98
$ZnCl_2$	31	8
$CuSO_4$	72	18
$CaCl_2$	48	6
$Ba(OH)_2$	0	24

2.6 林肯链霉菌 GS 的底物专一性

在 GS 生物合成反应系统中,采用 ATP 的类似物 GTP、CTP、UTP、ADP、 $NH_4Cl$  的类似物羟胺进行了分析,结果见表 5。GTP、CTP、UTP 取代 ATP 时 GS 无活力。ADP 取代 ATP 时,与对照相比, $Mn^{2+}$  激活时,GS 活力只有 60%; $Mg^{2+}$  激活时,GS 活力只有 36%。羟胺取代  $NH_4Cl$ , $Mn^{2+}$  激活时,GS 活力只有对照的 48%; $Mg^{2+}$  激活时,GS 活力只有对照的 31%。表明林肯链霉菌的 GS 具有较强的底物专一性。

表5 林肯链霉菌GS生物合成活力的底物专一性

Table 5 Substrate specificity of glutamine synthetase biosynthetic activity

底 物 Substrates	GS <sub>B</sub> 相对活力 Relative activity (%)	
	$Mn^{2+}$ as cofactor	$Mg^{2+}$ as cofactor
ATP	100	100
GTP	0	0
CTP	0	0
UTP	0	0
ADP	60	36
$NH_4Cl$	100	100
$NH_2OH$	48	31

2.7 林肯链霉菌谷氨酰胺合成酶的动力学

林肯链霉菌 GS 催化的生物合成反应具有重要的生理意义。因此,研究 GS 生物合成活性的动力学,对了解 GS 的调节性质很有意义。

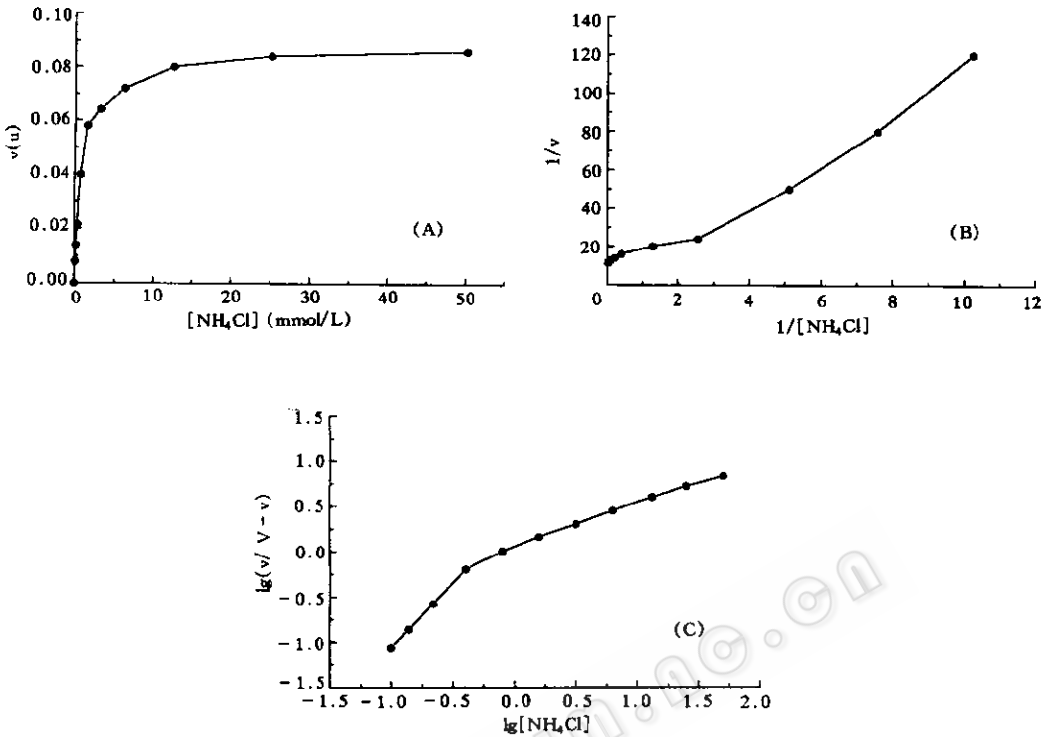


图4  $Mg^{2+}$ 作激活离子时GS对 $NH_4Cl$ 的动力学曲线

Fig.4 The kinetic curves of glutamine synthetase for  $NH_4Cl$  with  $Mg^{2+}$  as cofactor

(A) Saturation curve; (B) Lineweaver-Burk plot; (C) Hill profile.

林肯链霉菌GS与底物 $NH_4Cl$ 的饱和曲线不遵守米氏方程。Hill作图呈两相曲线。在标准分析条件下,当激活离子为 $Mg^{2+}$ 时,林肯链霉菌GS对 $NH_4Cl$ 的饱和曲线见图4-A。双倒数作图呈两个反方向的月牙形(图4-B),低浓度 $NH_4Cl$ 情况下,表观 $K_m$ 值为 $3.12 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。Hill系数 $n$ 值分别为1.43和0.49(图4-C)。激活离子为 $Mn^{2+}$ 时,GS对 $NH_4Cl$ 的饱和曲线见图5-A。GS最大活力范围很窄,当 $NH_4Cl$ 浓度大于 $1 \text{ mmol/L}$ 时,活力反而下降。双倒数作图不呈直线(图5-B)。在低浓度 $NH_4Cl$ 的情况下,GS对 $NH_4Cl$ 的表观 $K_m$ 值为 $2.89 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。Hill系数 $n$ 值分别为1.15和-0.45(图5-C)。

上述结果表明,无论激活离子是 $Mg^{2+}$ 还是 $Mn^{2+}$ ,在 $NH_4Cl$ 浓度低的情况下,Hill系数均大于1,具有正协同效应;当 $NH_4Cl$ 浓度增加到一定程度时,Hill系数则小于1,具有负协同效应<sup>[12]</sup>。这说明 $NH_4Cl$ 不仅作为林肯链霉菌GS的底物,而且作为一种效应物调节GS的活性。

林肯链霉菌GS对底物Glu及ATP的饱和曲线遵守米氏方程,双倒数作图呈直线。但不同的激活离子,GS对Glu、ATP的 $K_m$ 值却不同。

另外,林肯链霉菌GS转谷酰基活力对底物Gln、羟胺也遵从米氏方程,我们对其 $K_m$ 值作了测定。现将林肯链霉菌GS的 $K_m$ 值总结于表6(GS对底物 $NH_4Cl$ 的饱和曲线不遵守米氏方程关系,表观 $K_m$ 值均在低浓度 $NH_4Cl$ 情况下求得)。

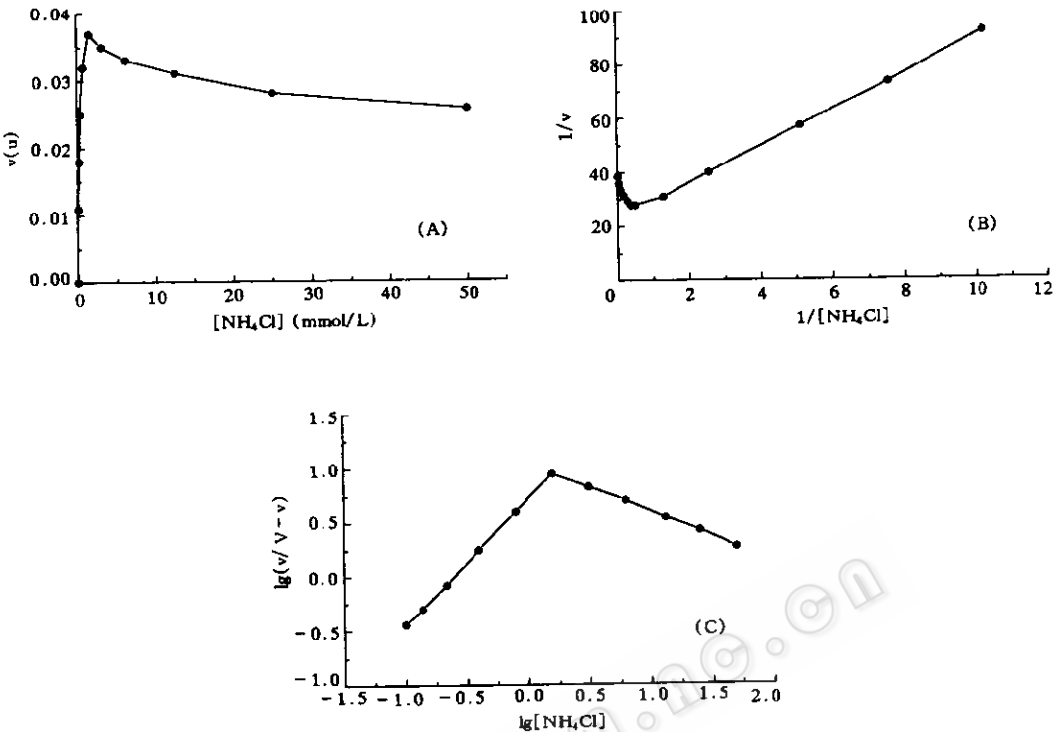


图 5  $Mn^{2+}$  作激活离子时 GS 对  $NH_4Cl$  的动力学曲线  
Fig.5 The kinetic curves of glutamine synthetase for  $NH_4Cl$  with  $Mn^{2+}$  as cofactor  
(A) Saturation curve; (B) Lineweaver-Burk plot; (C) Hill profile.

表6 林肯链霉菌GS的表现 $K_m$ 值\*

$K_m$ (mmol/ L)			
底 物	转谷酰基活性	生物合成活性 Biosynthetic activity	
Substrate	$\gamma$ -glutamyltransferase activity	$Mn^{2+}$ as cofactor	$Mg^{2+}$ as cofactor
Gln	8.33		
$NH_2OH$	1.78		
Glu		1.49	1.64
$NH_4Cl^*$		0.289	0.312
ATP		0.123	0.433

Deuel 等报道, *B. subtilis* GS 的动力学不遵守米氏方程<sup>[13]</sup>, 与林肯链霉菌 GS 类似。但是两者也有差别, *B. subtilis* GS 与底物  $NH_4Cl$ 、Glu 的饱和曲线都不遵守米氏方程, 而林肯链霉菌 GS 只是与底物  $NH_4Cl$  的饱和曲线不遵守米氏方程。

林肯链霉菌 GS 的动力学行为在很大程度上受到激活离子的影响。在  $Mn^{2+}$  为激活离子时,  $NH_4Cl$  的饱和曲线与激活离子为  $Mg^{2+}$  时不同。不同的激活离子, GS 对 Glu、ATP 的  $K_m$  值也不同(表 6)。同时, GS 活力的最适 pH、对反馈抑制剂的敏感程度都因激活离子不

同而有差异。大肠杆菌 GS 由于激活离子存在与否而表现出两种不同的状态,即紧密型 (taut) 和松弛型 (relaxed), 这两种状态的 GS 对反馈抑制剂的响应, 及酶活力都不同<sup>[8]</sup>。因此, 推测  $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  维持 GS 的不同构象, 调节了 GS 的活性<sup>[14]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] Shapiro B M, Stadtman E R. *Ann Rev Microbiol*, 1970, **24**:501~24.
- [2] Bender R A, Janssen K A, Resnick A D et al. *J Bacteriol*, 1977, **129**:1001~1009.
- [3] Jin Zhe, Jiao R. *Science in China (Series C)*, 1998, **41**(1):37~46.
- [4] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248~254.
- [5] Shapiro B M, Stadtman E R. *Meth Enzymol*, 1970, **17A**: 910~922.
- [6] Stadtman E R, Ginsburg A, Ciardi J E et al. *Advan in Enzyme Regul*, 1970, **8**:99~118.
- [7] 金 蓓, 焦瑞身. 微生物学报, 1998, **38**(1). 37~43.
- [8] Stadtman E R, Ginsburg A. *Enzymes*, 1974, **10**:755~807.
- [9] Tachiki T, Wakisaka S, Kumagai H et al. *Agric Biol Chem*, 1981, **45**:1487~1492.
- [10] Tachiki T, Wakisaka S, Suzuki H et al. *Agric Biol Chem*, 1983, **47**:287~292.
- [11] 顾薇玲, 陆小燕, 耿运其等. 科学通报, 1984, **13**:817~819.
- [12] Levitzki A, Koshland D E, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1969, **62**:1121~1128.
- [13] Deuel T F, Stadtman E R. *J Biol Chem*, 1970, **245**:5206~5213.
- [14] Chock P B, Huang C Y, Timmons R B et al. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1973, **70**:3134~3138.

## STUDIES ON CHARACTERIZATION OF GLUTAMINE SYNTHETASE FROM *STREPTOMYCES LINCOLNENSIS*

Jin Zhe Yang Yunliu Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

**Abstract** Glutamine synthetase from *Streptomyces lincolnensis* was purified to electrophoretic homogeneity. The effects of pH, temperature and metal ions on the purified enzyme were studied, and the substrate specificity of glutamine synthetase were reported. Under the standard biosynthetic assay system, the substrate saturation curves of glutamine synthetase from *Streptomyces lincolnensis* for ammonia did not agree with the Michaelis-Menten relationship, with either  $Mn^{2+}$  or  $Mg^{2+}$  as divalent cation, and Hill constants  $\neq 1$ . The  $K_m$  values of GS for Glu and ATP were different with different divalent cation.

**Key words** *Streptomyces lincolnensis*, Glutamine Synthetase, Characterization