

类产碱假单胞菌谷氨酸脱氢酶的纯化和性质^{*}

丁诗华¹ 杨志荣 唐亚雄 景仁志 刘世贵²

(四川大学生物工程研究所 成都 610064)

关键词 类产碱假单胞菌,谷氨酸脱氢酶,纯化和性质

分类号 Q554⁺.9 文献标识码 文章编号 0001-6209(1999)05-0475-77

谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, GDH)可逆催化谷氨酸脱氢生成 α -酮戊二酸和氨,是一种依赖 NAD(P)的脱氢酶。其分子形式主要为六聚体或四聚体,大多数 GDH 为六聚体^[1]。该酶广泛存在于原核生物和真核生物,在氮、碳代谢的联系方面发挥重要作用。至今已有很多细菌 GDH 得到详细研究^[2~4],但未见类产碱假单胞菌 GDH 的研究报道。本文通过研究类产碱假单胞菌 GDH 的纯化和性质,为揭示该菌的氮、碳代谢机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细菌培养

液体培养基为含柠檬酸和氯化铵的微量盐溶液。将类产碱假单胞菌接入该液体培养基,37℃ 培养 48h 后作为种子液,再进行扩大培养。

1.2 酶的纯化

菌体按 1:5 加 Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)匀浆,离心收集上清液即为粗酶液。再进行硫酸铵分级沉淀(45%~65%饱和度),DE32 柱层析、Sephadex G-200 柱层析及羟基磷灰石柱层析,得到纯化的 GDH。

1.3 酶活力测定

在 37℃、波长为 340nm 测定 GDH 催化辅酶氧化或还原所引起的光吸收值变化。测定液配制按文献^[2]方法,略有修改。每分钟催化 1 μ mol NADPH 氧化所需的酶量定义为一个酶活力单位(u)。

1.4 蛋白质含量测定

按 Bradford 的方法进行^[5],以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.5 电泳方法

PAGE 的凝胶浓度为 7.5%,SDS-PAGE 的凝胶浓度为 12%,聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳采用 5%~30% 的浓度梯度,均按标准方法进行^[6]。

2 结果

2.1 GDH 的分离纯化

粗酶液经硫酸铵分级沉淀、DE32 柱层析、Sephadex G-200 柱层析及羟基磷灰石柱层析后,获得 5.3mg GDH,比活力为 145.1 u/mg,纯化倍数为 558,活力回收约 12%。该酶样品经 PAGE 及 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白带(图 1 和图 2),说明所纯化出的 GDH 达到电泳纯。

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No. 39770014)

1 现工作单位:西南农业大学(重庆 400716);2 联系作者

收稿日期:1998-10-06,修回日期:1999-03-12

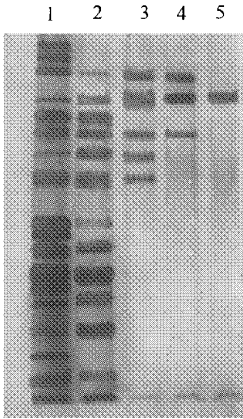


图 1 纯化过程的 PAGE 图谱

1. 粗酶液 ; 2. 硫酸铵沉淀 ; 3. DE32 层析的酶液 ;
4. Sephadex G-200 层析酶液 ; 5. 羟基磷灰石层析的酶液 .

2.2 分子量及亚基分子量测定

根据 GDH 在梯度 PAGE 和 SDS-PAGE 上的实验结果 ,测得该酶的分子量为 290 000 ,亚基分子量为 47 000 ,据此可以断定该酶由 6 个相同的亚基组成。

2.3 GDH 的专一性

在 GDH 催化的反应中 ,NAD⁺(H) 不能用 NAD⁺(H) 替代 ,说明该酶是一种依赖 NAD⁺(H) 的脱氢酶。此外 ,L-谷氨酸、α-酮戊二酸及 NH₄⁺ 亦不能用相应的类似物替代 ,可见该酶对底物具有高度专一性。

2.4 GDH 的动力学参数

根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法 ,测得 GDH 对谷氨酸、α-酮戊二酸及 NADP⁺ 的 K_m 值分别为 : 28mmol/L、1.2 mmol/L 及 0.063mmol/L。NH₄⁺ 或 NADPH 的浓度与酶反应速度的关系不符合 Michaelis-Menten 方程 ,按 Hill 作图法求得 $v = 0.5 V_{max}$ 时的底物浓度 [S]_{0.5} 分别为 :NH₄⁺ 24 mmol/L、NADPH 0.037 mmol/L。

2.5 GDH 的热稳定性和贮存稳定性

类产碱假单胞菌 GDH 的热稳定性与 pH 有关。在 pH7.0~9.0 时于 60℃ 保温 30min 酶活力无显著变化 ,pH 降至 5.0 时 ,60℃ 保温 15min 酶活力基本丧失。此外 ,纯酶在 -20℃ 或 -70℃ 保存时 ,有冷冻失活现象。但粗酶液在该条件下保存时 ,活力基本恒定。底物、D-谷氨酸或甘油可部分防止冷冻失活。

3 讨论

本实验纯化出的 GDH 为相同亚基构成的六聚体 ,与大多数细菌来源的 GDH 类似 ,但假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) AM1 的 GDH 则为四聚体^[2] ,亚基分子量为 50 000 ,说明同属细菌的 GDH 在酶学特征方面亦存在较大差异。此外 ,纯化条件也可导致 GDH 的分子形式发生改变 ,如 Janssen 等从铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中分离出的 GDH 为二聚体^[3] ,但后来却证明该 GDH 为六聚体^[4]。

细菌 GDH 在代谢中的作用并不相同。其中 ,NAD 依赖型 GDH 通常与谷氨酸的分解代谢有关 ,而 NADP 依赖型 GDH 则主要参与氨同化作用^[7]。类产碱假单胞菌 GDH 对谷氨酸的 K_m 值远远高于对 α-酮戊二酸的 K_m 值 ,提示该酶可能也与氨同化有关。但该酶对 NH₄⁺ 的 [S]_{0.5} 较高 ,提示只有 NH₄⁺ 浓度较高时 ,细菌才可利用 GDH 合成谷氨酸。

类产碱假单胞菌 GDH 的热稳定性不及嗜热细菌 GDH。此外 ,该酶还有冷冻失活现象 ,但粗酶液中

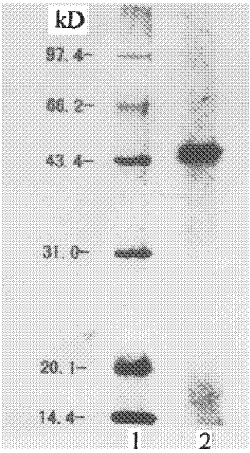


图 2 GDH 和标准蛋白质的 SDS-PAGE 图谱

1. 标准蛋白质 ;
2. 纯化的 GDH.

www.im.ac.cn

的某些物质对 GDH 构象可能有稳定作用,可使 GDH 免遭冷冻破坏。类产碱假单胞菌 GDH 的其它性质及其在氮、碳代谢中的作用仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Britton K L, Baker P J, Rice D W *et al.* *Eur J Biochem*, 1992, **209** 851~859.
- [2] Bellion E, Tan F. *J Bacteriol*, 1984, **157** (2) 435~439.
- [3] Janssen D B, Camp H J M, Leenen P J M *et al.* *Arch Microbiol*, 1980, **124** 197~203.
- [4] Smits R A M M, Pieper F R, van der Drift C. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **801** 32~39.
- [5] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72** 248~254.
- [6] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.* *Current Protocols in molecular biology*. USA: John Wiley & Sons, Inc. 1997, 10.2.4~10.6.8.
- [7] Wen Z, Morrison. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** 3826~3833.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE FROM *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES* *

Ding Shihua Yang Zhirong Tang Yaxiong Jing Renzhi Liu Shigui
(Institute of Bioengineering, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract Glutamate dehydrogenase was purified from the crude extract of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. The enzyme had a molecular weight of 290 000 and was composed of six subunits with identical molecular weight of 47 000. The enzyme was highly specific for NADP(H) and the substrates. The biochemical properties such as kinetic parameters and heat stability were also examined. The purified GDH showed considerable loss of activity upon freezing.

Key words *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, Glutamate dehydrogenase, Purification and Property

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39770014)