

# 用大肠杆菌磷酸转乙酰酶测定辅酶 A

中国科学院微生物研究所烃代谢组\*

(北 京)

已报道的辅酶 A (CoA) 测定方法中, 磷酸转乙酰化法<sup>[1]</sup>能按 Lipmann 的定义确定试样的含量单位, 不需要标准品, 但方法费时而且专一性较差; 柠檬酸裂解酶法<sup>[2]</sup>对 CoA 的专一性高, 但必须同时有标准品作对照;  $\beta$ -羟酰基辅酶 A 脱氢酶法<sup>[3, 4]</sup>能同时测定试样中的还原型 CoA 和总 CoA (还原型 CoA + 氧化型 CoA), 但专一性较差。Bergmeyer 提出的磷酸转乙酰酶 (简称 PTA 酶) 紫外光吸收法<sup>[4]</sup>能较准确测定还原型 CoA, 该酶可由克氏梭状芽孢杆菌 (*Clostridium kluyveri*) 制备, 酶的比活高但菌体较难培养。Abiko 等用 PTA 酶砷解法测定 CoA<sup>[5]</sup>方法简便, 专一性强, 但也必须标准品。

我们用硫酸铵分级法从大肠杆菌 (*Escherichia coli*) AS 1.505 提纯的 PTA 酶, 可以应用在

紫外光吸收法测定还原型 CoA 的实验中。此外, 实验表明, 用砷解法测得的是总 CoA。因此, 结合这两种方法, 即可确定 CoA 的绝对量, 而无需另备标准品。

## 材 料 和 方 法

### 一、试剂

CoA: 无锡第三制药厂出品。乙酰磷酸二锂: 纯度 80%, 按 Stadtman 方法合成和测定纯度<sup>[6]</sup>。

### 二、菌种

大肠杆菌 AS. 1.505, 由本所保藏组提供。

---

\* 徐岩、刘如臻同志协助进行菌体超声波破碎工作。

### 三、PTA 酶的制备

#### (一) 菌的培养

培养基: 葡萄糖 1%, 磷酸氢二钾 0.8%, 蛋白胨 0.4%, 酵母膏 0.4%, 过滤, 8 磅灭菌 20 分钟。

将大肠杆菌 AS.1.505 先在牛肉汁斜面上活化 24 小时, 每三支试管斜面上的培养物接入 80 毫升培养液, 28℃ 摇床培养 24 小时作为种子液, 在装有 80 毫升培养液的 500 毫升三角瓶中加入 8 毫升种子液继续培养 15 小时备用。

#### (二) 酶的制备

离心收集菌体, 用水洗两次, 每 5 克湿菌体悬浮于 25—30 毫升 0.2M Tris (pH 8.0) 缓冲液中, 20 KC 超声波处理 20 分钟, 悬液温度应不高于 5℃。在 2—4℃, 4000 转/分离心 20 分钟后, 再在 12000 转/分离心 20 分钟 (以下均同), 向上清液中滴加 4℃ 的饱和硫酸铵溶液使饱和度为 20%, 离心, 上清液加酸性饱和硫酸铵 (每升饱和硫酸铵中加入 3 毫升浓硫酸), 使饱和度为 30%, 离心除沉淀后依次作 35% 和 40% 饱和度的分级。PTA 酶主要集中在硫酸铵饱和度为 35—40% 时的沉淀中。重复上述操作可提高比活, 经两次分级后, 沉淀用 0.2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0.2M Tris (pH 8.0) 缓冲液溶解, 使蛋白质浓度约 10 毫克/毫升, 按每管 0.2 毫升分装, 冷冻干燥, 用时以 1—2 毫升 0.2M Tris 缓冲液溶解。

### 四、PTA 酶的活力测定

按 Stadtman 等方法测定<sup>[5, 7]</sup>, 其原理是存在 PTA 酶时砷解的乙酰磷酸盐的量与加入的 CoA 量有关。混合 0.1 毫升酶液与 6 微克分子乙酰磷酸二锂、10 微克分子半胱氨酸、20 微克分子 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 和 5 单位 CoA, 总体积 0.8 毫升, 25℃ 保温 5 分钟后加 0.2 毫升 0.25M 砷酸钾溶液 (pH 8.0), 准确保温 15 分钟, 用羟肟酸法测定残余的乙酰磷酸二锂。规定在上述条件下存在 5 单位总 CoA 时催化分解 1 微克分子乙酰磷酸二锂所需的酶量为 1 单位的 PTA 酶。蛋白质按 Lowry 等的方法测定<sup>[8]</sup>。

### 五、CoA 的测定

#### (一) PTA 酶紫外光吸收法测定还原型 CoA

PTA 酶催化乙酰磷酸盐和 CoA 之间的可逆反应, 在乙酰磷酸盐过量时反应实际上是定量的, 因为 233 毫微米波长处乙酰辅酶 A 的光吸收较 CoA 要强, 测定光密度的增加即可算出还原型 CoA 的含量。测定步骤是: 在光程 1 厘米石英比色杯中依次加入 2.79 毫升 0.1M Tris 缓冲液 (pH 8.0), 0.10 毫升 0.1M 乙酰磷酸二锂和 0.10 毫升 CoA 样品, 混匀后测定光密度  $E_0$ , 再加入 0.010 毫升 PTA 酶液, 测定光密度, 当光密度达最大值时 (约需 5 分钟) 读数为  $E_1$ , 再加入 0.010 毫升 PTA 酶液, 测定其光密度  $E_2$ 。则酶本身的光密度值  $\Delta E_{\text{PTA}} = E_2 - E_1$ , 乙酰辅酶 A 与 CoA 的光密度差  $\Delta E = E_1 - E_0 - \Delta E_{\text{PTA}}$ 。因为每毫升试液中还原型 CoA 的微克分子数 =  $\Delta E \times V / \Delta \epsilon \times d \times v^{[4]}$  [ $V$  为测定体系的总体积 (毫升),  $v$  为向测定体系中加入的 CoA 溶液体积 (毫升),  $d$  为光程 (厘米),  $\Delta \epsilon$  为乙酰辅酶 A 与还原型 CoA 的克分子消光系数之差,  $\Delta \epsilon_{233} = 4.44 \times 10^6$  厘米<sup>2</sup>/克分子, 在上述条件下  $V = 3$ ,  $v = 0.1$ ,  $d = 1$ ], 所以每毫升试液中还原型 CoA 的微克分子数 =  $\Delta E \times 3 / 4.44 \times 0.1 = 6.76 \Delta E$ 。

#### (二) PTA 酶砷解法测定总 CoA

在 PTA 酶的作用下, 乙酰磷酸盐与 CoA 生成乙酰辅酶 A, 存在过量的砷酸盐时乙酰辅酶 A 与砷酸盐形成中间产物乙酰辅酶 A 砷酸盐, 由它水解出的 CoA 又再次参加反应。在酶量一定、乙酰磷酸盐和砷酸盐都过量时反应速度和反应物中 CoA 的量成正比, 测定剩余的乙酰磷酸盐即可算出总 CoA 的相对量。

操作时, 在一组试管中依次加 0.2M Tris (pH 8.0) 缓冲液 0.1 毫升, 0.08M 乙酰磷酸二锂溶液 0.1 毫升, 0.1M 半胱氨酸 (pH 7.5) 溶液 0.1 毫升, 不加和加有 1—8 单位的标准 CoA 及待测样品, 加水补足体积到 0.8 毫升, PTA 酶 (每管酶制剂用 3 毫升 0.2M Tris 缓冲液溶解) 0.1 毫升, 反应混合物在 25℃ 保温 5 分钟后, 加入

0.5M 磷酸钾溶液 (pH 8.0) 0.1 毫升, 准确保温 15 分钟, 加 2.0 毫升中性羟胺溶液(用前将 28% 盐酸羟胺、14% 氢氧化钠以及 pH 5.4 的 0.1M 乙酸钠缓冲液按 1:1:2 混合), 10 分钟后加入 3 毫升氯化铁混合液 (3N HCl, 12% 三氯乙酸, 5% 三氯化铁按 1:1:1 混合), 离心除去沉淀后, 上清液用 0.5 厘米比色杯在 540 毫微米波长测定光密度。将不含 CoA 样品的光密度值减去其他各管样品的光密度值即为与相应 CoA 作用的乙酰磷酸盐的值, 以此作标准曲线并求出未知样品的 CoA 量。

(三) 总 CoA/还原型 CoA 的测定

在上述酶解体系中如加有半胱氨酸, 即能将氧化型 CoA 定量地还原成还原型 CoA, 因而测出的是总 CoA。如不加半胱氨酸, 则测得的是还原型 CoA。

测定时用加有和加不加半胱氨酸的 (不加时用水补足体积) 两组试管, 按上述步骤操作, 可得到总 CoA 和还原型 CoA 的相应曲线。

结 果

一、PTA 酶的比活

大肠杆菌 AS. 1505 的粗提取液中 PTA 酶的比活约 2.8 单位/毫克, 用硫酸铵分级后, 35—37% 硫酸铵饱和度的部份, 比活为原液的 10—15 倍, 纯化各步中酶的比活见表 1。

表 1 大肠杆菌 AS. 1505 的 PTA 酶的部分纯化

纯化步骤	总活力 (单位)	总蛋白质 (毫克)	比活力 (单位/毫克)	活力回收 (%)
粗提取液	10540	3750	2.8	100
20%饱和硫酸铵分级的上清液	10440	3118	3.4	99
35—40%饱和度的酸性硫酸铵沉淀	7000	500	14.0	67
重复分级, 取 35—37%酸性饱和硫酸铵沉淀	7000	225	31.1	66.4

二、用大肠杆菌 AS. 1505 的 PTA 酶以紫外光吸收法测定还原型 CoA

用上法制得的 PTA 酶作紫外光吸收测定

某 CoA 制剂中的还原型 CoA, 结果见表 2。PTA 酶紫外光吸收法对酶的要求较高。

表 2 用大肠杆菌 AS. 1505 的 PTA 酶紫外光吸收法测定还原型 CoA

测定值 \ 测定次数	I	II	III
$E_0$	0.377	0.378	0.378
$E_1$	0.567	0.567	0.597
$E_2$	0.599	0.600	0.658
$\Delta E_{PTA}$	0.032	0.033	0.061*
$\Delta E$	0.158	0.156	0.158
还原型 CoA (单位/毫升)	328	324	328

\* PTA 酶用量是 I, II 的加倍。

三、氧化型 CoA 的叠加

由于 PTA 酶酶解法测定 CoA 的体系中含有半胱氨酸, 我们在待测样品中分别添加 10% 和 20% 的氧化型 CoA 与原样品同作含量-光密度曲线进行比较, 实验表明, 加入的氧化型 CoA 能定量回收 (见图 1)。

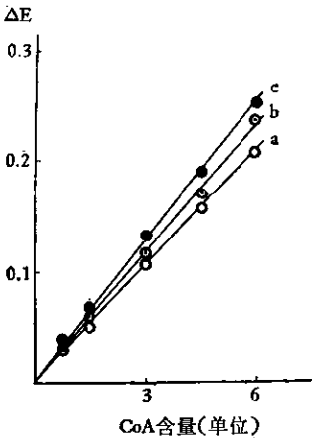


图 1 氧化型 CoA 的叠加

a: CoA 标准曲线; b: 添加了 10% 氧化型 CoA; c: 添加了 20% 氧化型 CoA

此外, 在含半胱氨酸的反应体系中能单独定量测定氧化型 CoA, 如不含半胱氨酸, 则氧化型 CoA 的测定值为 0。

#### 四、总 CoA/还原型 CoA

结果三表明,对于同一个 CoA 制剂,如在测定体系中加或不加半胱氨酸作标准曲线,便可获得两条不同斜率的直线(见图 2)。从而可求得该制剂中总 CoA 量(加半胱氨酸)与还原型 CoA 量(不加半胱氨酸)之比  $f$ 。

$f = \text{测定体系中加半胱氨酸时的斜率} / \text{测定体系中不加半胱氨酸时的斜率}$

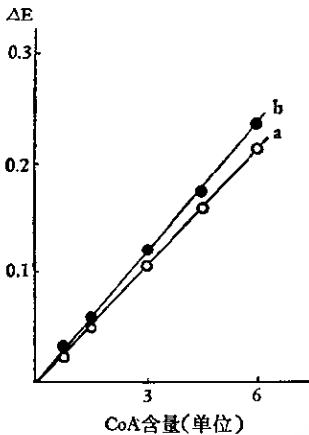


图 2 总 CoA 含量与还原型 CoA 含量的关系  
a: 不加半胱氨酸 b: 加半胱氨酸

#### 五、CoA 的标定

由于 PTA 酶紫外光吸收法能测定 CoA 制剂中还原型 CoA 的绝对量,因此将其与结果四结合起来可直接求出总 CoA 的绝对量。

$$\text{总 CoA} = \text{“还原型 CoA”} \times f$$

“还原型 CoA”为紫外光吸收法测定值。

#### 讨 论

1. 通过在 PTA 酶砷解法反应系统中加入不同量氧化型 CoA 能被定量回收的实验表明,此法测定的是总 CoA。

2. PTA 酶砷解法需要 CoA 标准品,既然该

法测的是总 CoA,则标准品亦应以总 CoA 表示。倘若直接用 PTA 酶紫外光吸收法测得的还原型 CoA 值作为标准,而该制剂中还含有氧化型 CoA 时(这是很经常的),则测得的值会偏低。

3. 根据在砷解法反应系统中半胱氨酸的还原作用<sup>[9,10]</sup>,我们将 PTA 酶的砷解法与紫外光吸收法结合起来,初步提出了确定总 CoA 的方法,这将有助于改善砷解法的准确性。由于测得的是 CoA 的绝对量,故不另需标准品。而且只要该 CoA 制剂中还原型 CoA 的含量足够高,就可作为 CoA 的标准品。它有两个指标,即还原型 CoA 和总 CoA 的含量,用后一个指标作砷解法的标准是合适的。

4. Stadtman 和 Abiko 等作砷解法时,标准品均用磺酰胺乙酰化法确定,由于此法与砷解法的专一性不同,也有可能造成相当的偏差,采取本文提出的方法可免除这一可能性。

#### 参 考 文 献

- [1] Kaplan, N. O. and F. Lipmann: *J. Biol. Chem.*, 174: 37, 1948.
- [2] Srere, P. A.: *J. Biol. Chem.*, 236: 50, 1961.
- [3] Lynen, F. and O. Wieland:  $\beta$ -ketoreductase, *Methods in Enzymology* (ed. by Colowick, S. P. and N. O. Kaplan) Vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 566.
- [4] Bergmeyer, H. U.: *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim and Academic Press, New York, 1963, p. 517.
- [5] Abiko, Y., T. Suzuki and M. Shimizu: *J. Biochem.* (Tokyo), 61: 10, 1967.
- [6] Stadtman, E. R.: Preparation and Assay of Acetyl Phosphate, *Methods in Enzymology* (ed. by Colowick, S. P. and N. O. Kaplan) Vol. III, Academic Press, New York, 1957, p. 229.
- [7] Stadtman, E. R., G. D. Novelli and F. Lipmann: *J. Biol. Chem.*, 191: 365, 1951.
- [8] Lowry, O. H., H. J. Rosebrough, A. L. Farr et al.: *ibid*, 193: 265, 1951.
- [9] Stadtman, E. R.: *ibid*, 196: 535, 1952.
- [10] Matuo, Y., T. Tosa and I. Chibata: *Biochim. Biophys. Acta*, 338: 520, 1974.