

# 用同位素竞争技术与 L-天门冬酰胺酶相关的代谢产物

孟广震 郝凤兮 钱世钧 何忠效

(中国科学院微生物研究所, 北京)

同位素竞争 (isotopic competition) 技术是揭示各种代谢产物相关性的有效而便捷的手段<sup>[1]</sup>。Roberts<sup>[2]</sup> 等曾报告借助这一方法考查野生型大肠杆菌氨基酸生物合成的途径。该研究技术基于以下原理: 在以  $^{14}\text{C}$ -葡萄糖为唯一碳源的培养基上培养微生物, 放射性  $^{14}\text{C}$  将分布于微生物体的各种氨基酸中。倘若同时把某已

知的非放射性前体物质加入培养基中, 则微生物就优先利用这一前体物质, 从而降低一些氨基酸的  $^{14}\text{C}$  掺入量, 这便可以证明这些氨基酸确为该前体物质的代谢产物, 进而可推断其某代谢途径。

大肠杆菌 AS 1.357 是 L-天门冬酰胺酶的生产菌株<sup>[3]</sup>, 该菌株又系甲硫氨酸和组氨酸双

缺陷型突变株。为研究这一突变菌株与 L-天门冬酰胺酶相关的代谢产物对该酶活力的可能影响,参照 Roberts<sup>[2]</sup> 的方法用同位素竞争技术检测了各种氨基酸在代谢上与 L-天门冬酰胺酶的相关性。本文报道有关实验技术和主要结果。

## 实验方法及结果

1. 预培养: 为避免培养过程中出现生长延迟期而影响分析结果,首先必须进行预培养以获得对数生长期的种子。考虑到大肠杆菌 AS 1.357 是双缺陷型突变株,本实验所采用的全合成培养基除无机盐和葡萄糖外,还应含有适量甲硫氨酸和组氨酸。调整后的培养基组成为 (%):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.2;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.51;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3;  $\text{NaCl}$  0.3;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0037;  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.026; 葡萄糖 0.1。取上述培养基 20 毫升置三角瓶中,加入 0.8% L-组氨酸和 1.6% DL-甲硫氨酸各 0.5 毫升,然后将一支新鲜斜面上的菌接入培养基中,于 37℃ 振荡培养 2 小时左右,离心,再用少量生理盐水悬浮,再离心,所得湿细胞即为对数生长期种子。见图 1。

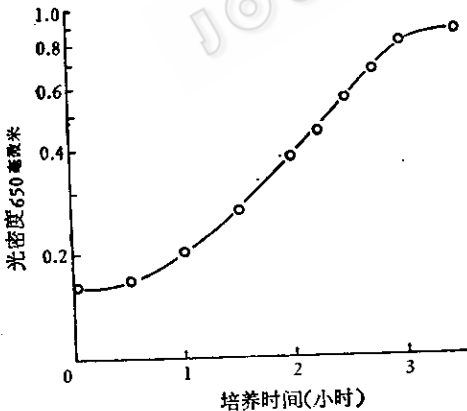


图1 AS1.357 菌在预培养中的时间与光密度的关系

2. 实验培养: 所用培养基组成除用全标记  $^{14}\text{C}$ -葡萄糖代替普通葡萄糖外,其他均同预培养。先用无机盐培养基悬浮湿细胞使 650 毫微米处的光密度达 0.07—0.075,取该菌悬液 20

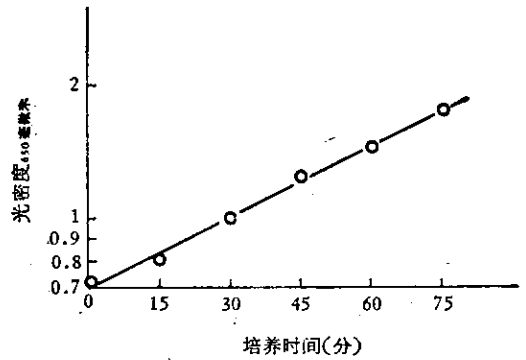


图2 大肠杆菌 AS1.357 的培养时间与光密度的关系

毫升,分别加入 0.5 毫升组氨酸和甲硫氨酸溶液,最后再加入 5.4% 葡萄糖 74 微升(每瓶加 4 毫克,7 微居/毫克),在 37℃ 振荡培养 1 小时后光密度约增加一倍,培养过程中未出现明显的延迟期,结果见图 2。根据需要在培养液中加入非放射性前体氨基酸。

3. 菌体蛋白的抽提、收集和水解: 将培养终了的细胞悬浮物离心,用少量生理盐水洗涤,再离心得湿细胞。然后按以下程序依次处理: 将湿细胞悬浮于 4 毫升 5% 的三氯乙酸中,5℃ 放置 30 分钟,离心,弃去上清液,将沉淀悬浮于 4 毫升 75% 乙醇中,在 40—50℃ 保温 30 分钟,离心弃去上清液得沉淀。将沉淀悬浮于 4 毫升混合溶剂中(等体积乙醇和乙醚混合),40—50℃ 保温 15 分钟,离心去掉上清液,沉淀悬浮于 4 毫升 5% 三氯乙酸中,置沸水浴中保温 30 分钟,离心得沉淀,用少量乙醇和乙醚洗涤,这时得到的就是菌体蛋白。最后将 0.2 毫升 6N 盐酸加至菌体蛋白中,在封闭玻璃管内 108℃ 水解 15 小时。水解完成后,将管内残余之盐酸除去。

4. 菌体蛋白水解产物的纸上层析和放射性掺入量的测定: 将水解产物残渣用少量蒸馏水溶解,全部转移到 Whatman No. 1 滤纸上,进行双向层析,第一次用正丁醇-甲酸-水(体积比 70:10:20)做溶剂展开二次,第二次用苯酚-水-浓氨水(80:20:1)做溶剂展开一次,用茚三酮或吡啶酮显色后,将各种氨基酸色斑剪下,浸入 5 毫升闪烁液中,用液体闪烁仪测定其放射

表 1 加入前体物对大肠杆菌 AS1.357  $^{14}\text{C}$  掺入  
各种氨基酸的影响

氨基酸名称	$^{14}\text{C}$ 掺入量* (%)	
	加入 4 毫克 L-天门冬酰胺	加入 4 毫克 L-天门冬氨酸
天门冬氨酸	44.40	8.56
谷氨酸	84.69	30.44
丝氨酸	102.86	90.13
甘氨酸	94.52	99.98
苏氨酸	63.24	23.14
丙氨酸	105.54	56.28
赖氨酸	69.60	54.87
苯丙氨酸	100.53	111
异亮氨酸	53.63	38.12

\* 以未加前体物的培养物为对照,按 100% 计,其每分钟计数值一般在数万至十几万之间。以上数据是 2 批或 3 批数据的平均值。

性强度,结果见表 1。

## 讨 论

根据现有关于氨基酸合成代谢的知识<sup>[4]</sup>,对表 1 中  $^{14}\text{C}$  掺入数据可做如下解释:

1. 外加天门冬酰胺或天门冬氨酸,可被微生物优先利用,所以 L-天门冬氨酸掺入量最低。

2. 天门冬氨酸是苏氨酸、异亮氨酸和赖氨酸的共同前体,当加入天门冬酰胺或天门冬氨酸后,上述三种氨基酸的掺入量大幅度下降。

3. 丝氨酸、甘氨酸和苯丙氨酸在代谢上和天门冬氨酸无直接相关性,故当加入天门冬氨酸或天门冬酰胺后,它们的  $^{14}\text{C}$  掺入量无明显变化。

4. 按作者<sup>[5]</sup>以前报告的方法测得大肠杆菌 AS 1.357 含有一定量的天门冬氨酸酶活力(每克全细胞和破碎细胞的活力分别为 10,985 单位和 29,559 单位)。该酶可催化天门冬氨酸和延胡索酸之间的可逆转变,当天门冬氨酸过量时,可以将其转成延胡索酸,进入三羧酸循环,从而间接使谷氨酸和丙氨酸  $^{14}\text{C}$  掺入量下降。此外,天门冬氨酸的脱羧反应也可导致丙氨酸  $^{14}\text{C}$  掺入量下降。而天门冬酰胺过量时则对这两种氨基酸的  $^{14}\text{C}$  掺入量影响不大。

5. 比较表 1 两组数据可见:加入天门冬氨酸所引起的掺入量改变远较加入天门冬酰胺的情况明显。这可能因为:(1)微生物细胞内天门冬氨酸除来自天门冬酰胺外还可以有相当数量来自放射性葡萄糖;(2)在本实验特定条件下,前体天门冬酰胺的过量存在并不能立即造成天门冬氨酸的过量存在。加之该酶所催化的是一个不可逆反应,所以可以推测 L-天门冬酰胺酶在代谢上可能行使某种调节作用。

上述实验结果为进一步研究 L-天门冬酰胺酶的调节机理提供了有意义的线索。

## 参 考 文 献

- [1] Cohen, G. N.: *The Regulation of cell Metabolism*, Holt, Rinehart and Winston, Inc., 1968. pp. 93—99.
- [2] Roberts, R. B., et al.: *Studies of Biosynthesis in Escherichia coli*, Kirby lithographic company, Inc., 1957.
- [3] 孟广震等: 科学通报, 19(8): 376—378, 1974.
- [4] Umbarger, H. E.: *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 533—606, 1978.
- [5] 孟广震等: 微生物学报, 18(1): 39—44, 1978.