

葡萄糖异构酶的纯化和拉曼光谱

李长清* 黄程芳 黎洋 王宗睦

(吉林大学分子生物学系, 长春)

摘要 采用 *Streptomyces roseochromagenus* No. 336 细胞丙酮干粉, 经抽提、DEAE-纤维素和 DEAE-Sephadex A-50 层析, Sephadex G-200 凝胶过滤, 得到了电泳纯的葡萄糖异构酶, 以这种均一态酶测定了其激光拉曼光谱。

关键词 葡萄糖异构酶; 纯化; 激光拉曼光谱

葡萄糖异构酶 (GI. 5.3.1.5) 能催化 D-葡萄糖可逆地转化为 D-果糖^[1-3]。自 1957 年 Marshall 等人在假单胞杆菌中发现 GI 以来, 国外已对不同来源的 GI 的分离纯化进行了不少研究, 并取得了一些重要结果^[4-6]。但这些方法均比较繁琐, 费时较长。本文对 GI 纯化程序的简化作了一些探讨, 较迅速地获得电泳纯酶并用于光谱学等的研究。

材料和方法

1. 菌种: *Streptomyces roseochromagenus*

No. 336。

2. 试剂: DEAE-纤维素 52 (whatman 产品, 进口分装); DEAE-Sephadex A-50 (pharmacia 产品); Sephadex G-200 (whatman 产品, 进口分装); 其余的化学药品均为国产 AR 试剂。

3. 仪器: MD-500 发酵装置(体积 5 升)为日本 L. E. M. Marbishi 公司生产; LKB 2211 层析柜(瑞典 LKB 公司产品); SX 721 分光光

* 现通讯地址: 成都, 中国医学科学院输血研究所血浆蛋白室。

度计(山东高密分析仪器厂生产); DYY-III 电泳仪(北京六一仪器厂生产)。

4. 细胞培养: 发酵培养基的配比(g): 木糖 0.5, 淀粉 0.5, 蛋白胨 0.5, 牛肉浸膏 0.5, NaCl 0.5, 酵母膏 0.25, 玉米浆 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 和 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.024, 以水定容至 100 ml, pH 7.3。细胞于 30℃, 以 120 r/min 振荡培养 17 小时, 得种子悬液。按 10% 接种量转入 4 升培养基中, 在 30℃ 培养约 20 小时, 通风量为 2.5 L/min。

5. 活力测定: 采用改进的半胱氨酸-吡唑法定果糖含量^[7]。活力单位定义为每分钟生成 1.0 微克分子果糖所需的酶量。

6. 蛋白浓度测定: 采用 Lowry 等人^[8]的方法。

7. 纯度鉴定: 采用 Davis 等人的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳^[9]和薄层扫描的方法。

8. 激光拉曼光谱测定: 谱图由 Spex 1403 0.85 m Double Spectrometer 记录, 激光波长 5145 Å, 功率 300 mW, 狭缝宽度 750 mm, 扫描速度为 2 波数/min。GI 浓度为 30 mg/ml, 使用平底毛细管, 光束沿毛细管轴成 135° 角照射, 光谱仪配置 Spex DMIB Spectroscopy Laboratory Coordinator 计算机, 信号累加 5 次^[10]。

结果与讨论

(一) 丙酮干粉制备

于发酵终期, 在 700 × g 下收获细胞。以蒸馏水洗涤菌泥, 并重复离心, 洗至上清液无色为止。然后加入菌泥体积 10 倍以上的冰冻丙酮, 充分搅拌, 抽滤, 并用冷丙酮反复洗涤, 直至滤液和加入丙酮颜色一样为止, 继续抽干, 即制得丙酮干粉。

(二) 纯化

1. 抽提: 按干粉(g): 缓冲液(ml)为 1:30 和 1:15 之比例, 加入 0.05 mol/L, pH 7.5 的磷酸缓冲液, 于搅拌下, 分别抽提两次, 时间分别为 3 小时和 2 小时, 于 4000 r/min 离心 10 分钟, 合并上清即为粗酶液。

2. DEAE-纤维素 52 层析: 将上述抽提的酶液上事先已平衡好的 DEAE-纤维素 52 柱, 以同样缓冲液流洗后, 依次以含 0.15 mol/L, 0.25 mol/L 和 0.35 mol/L NaCl 的缓冲液进行分段洗脱, 收集 0.25 mol/L NaCl 时洗脱的活力峰(洗脱曲线见图 1)。

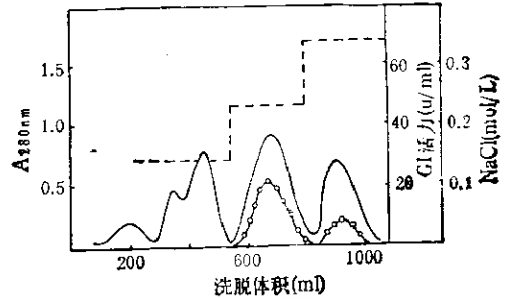


图1 DEAE-纤维素 52 柱层析

柱规格: $\phi 2.5 \times 25$ cm, 流速 20—40 ml/h
—蛋白质, ○—○ GI 活力 (u/ml), ---- NaCl 浓度

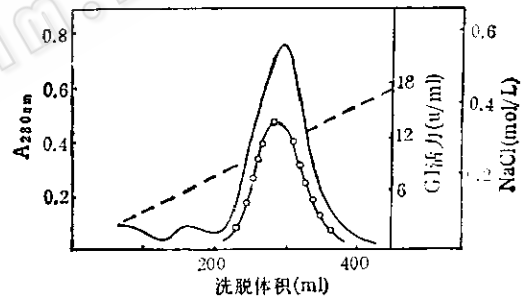


图2 DEAE-Sephadex A-50 层析

柱规格: $\phi 2 \times 30$ cm, 流速 15—25 ml/h
—蛋白质, ○—○ GI 活力 (u/ml), ---- NaCl 浓度

3. DEAE-Sephadex A-50 层析: 将上步收集的活力峰上 DEAE-Sephadex A-50 柱, 以同样缓冲液流洗后, 用含 0—0.5 mol/L NaCl 的上述缓冲液进行连续梯度洗脱, 收集 0.35 mol/L 左右的活力峰(洗脱曲线见图 2)。

4. Sephadex G-200 凝胶过滤: 将上步收集的酶峰, 经聚乙二醇 20000 反透析浓缩后, 20000 r/min 离心 5 分钟, 取一定量上 Sephadex G-200 柱, 以该缓冲液流洗, 收集活力峰(流洗曲线见图 3)。

经上述提纯程序, GI 被提纯为均一的一

表1 葡萄糖异构酶分离纯化

提纯步骤	总蛋白 (mg)	总活力 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	比活 (u/mg)	收率 (%)
两次抽提	1548.0	4327.5	2.8	100
DEAE-纤维素 52 层析	168.3	2099.5	12.4	48.5
DEAE-Sephadex A-50 层析	61.6	1273.2	20.7	29.4
Sephadex G-200 凝胶过滤	20.0	479.8	24.9	11.5

纯度达到 95% 以上。可见,酶被提纯至均一状态(图 4)。

(四) GI 的激光拉曼光谱

采用上述获得的均一态酶,测得其激光拉曼光谱(图 5)。

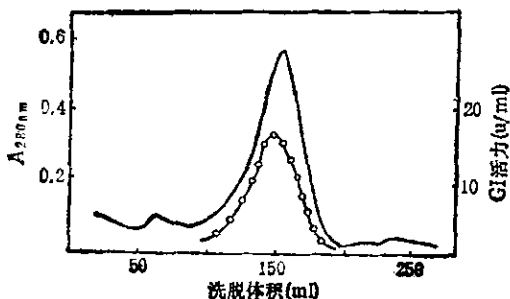


图3 Sephadex G-200 凝胶过滤
柱规格: $\phi 3 \times 100\text{cm}$, 流速 8—12 ml/h
—蛋白质, ○—○ GI 活力 (u/ml)

条带电泳纯精品。酶被提纯 8.9 倍,比活 24.9 u/mg ,总收率为 11.5% (表 1)。

(三) 纯度鉴定

采用 Davis 等人的盘状电泳以及薄层扫描对凝胶过滤后的酶峰进行了纯度鉴定。端电压为 40—50 V/管,电流强度为 3 mA/管,电泳 3 小时。采用考马斯亮蓝 R-250 为染色剂染色 3 小时,以 7% 醋酸溶液进行脱色。然后将脱色后的电泳凝胶通过日本岛津 CS-910 薄层扫描仪进行线性扫描,吸收波长为 600 nm。结果

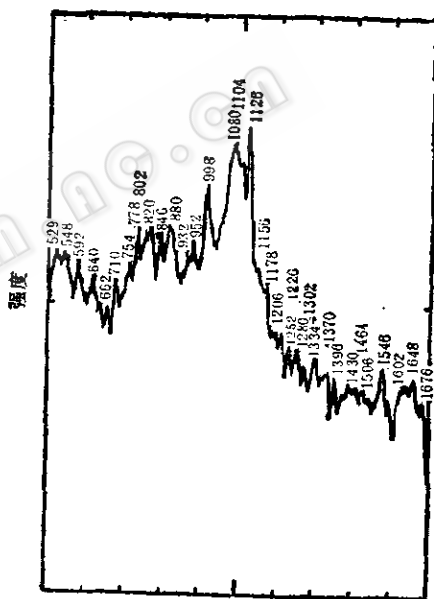


图5 GI 的激光拉曼光谱

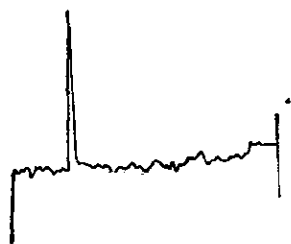


图4 GI 的聚丙烯酰胺凝胶电泳及其薄层扫描图

表明,盘状电泳显示一条带,薄层扫描图只出现一个很锐的峰,根据电泳凝胶吸收比,得知 GI

由上述图谱可知,GI 主链构象谱带集中在酰胺 I [1648 cm^{-1} (强)、 1676 cm^{-1} (弱)]和酰胺 III [1226 cm^{-1} (弱)、 1252 cm^{-1} 、 1280 cm^{-1} (强)]。看来,在 GI 主链构象中, α -螺旋含量较高,于 932 cm^{-1} 和 1302 cm^{-1} 处的两条谱带也进一步证实了这一点。本研究和本室所测得的圆二色性谱的结果是相一致的^[1]。此外,也存在一定量的无规则卷曲和少量的 β -折迭结构。

酪氨酸残基的谱峰位于 820 cm^{-1} 和 846

cm^{-1} 处,其峰强度之比 $I_{246}:I_{820}$ 为 0.96:1。由 GI 氨基酸组成和计算公式^[10],得知有 14 个 Tyr 残基“埋藏”在酶分子内部,另外 23 个 Tyr 残基“暴露”于酶分子表面。 778 cm^{-1} 是 Trp 残基的特征峰, 1370 cm^{-1} 表明有“埋藏”的 Trp 残基存在。 1156 cm^{-1} 、 1206 cm^{-1} 和 1602 cm^{-1} 峰为 phe 残基引起的。

529 cm^{-1} 和 548 cm^{-1} 两条谱带的存在,说明 GI 中含有二硫键,其中, 529 cm^{-1} 属于 gauche-gauche-trans 式结构, 548 cm^{-1} 属于 trans-gauche-trans 式结构。

998 cm^{-1} 属于 C-C 骨架伸缩振动; 1080 、 1104 和 1126 cm^{-1} 相应于 C-N 骨架伸缩振动,以上峰均很强,这与 GI 分子中含有大量 C-C 和 C-N 键相一致。 1396 cm^{-1} 是 $-\text{COO}^-$ 对称伸缩振动, 1430 cm^{-1} 是 $-\text{COOH}$ 伸缩振动,这与 GI 中富含酸性氨基酸是相吻合的。

实验表明,从细胞干粉出发,采用上述提纯程序,方法简单、易行且有效,用时较短,GI 可被纯化为均一状态。以这种酶液进行拉曼光谱学研究,取得了 GI 结构方面一些新的信息,为阐明 GI 结构与功能之间的关系,以及催化机理等提供理论依据。

参 考 文 献

1. Linko Y Y: *Process Biochemistry.*, July, 34, 1977.
2. Takasaki Y: *Agric. Biol. Chem.*, **30**: 1247, 1966.
3. Marshall R O: *Science.*, **125**: 648, 1957.
4. Takafumi Y: *Agric. Biol. Chem.*, **45**: 619, 1981.
5. Kwon H J: *Agric. Biol. Chem.*, **51**: 1983, 1987.
6. Takasaki Y: *Agric. Biol. Chem.*, **33**: 1527, 1969.
7. 张树政等: 酶制剂工业(下), 559 页, 科学出版社, 北京, 1984。
8. Lowry O H: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
9. Davis B J et al.: *Acad. Sci.*, **121**: 404, 1964.
10. 孙永泰等: 生物化学与生物物理进展, **10**(3): 64—68, 1984。
11. 周慧等: 吉林大学自然科学学报, **3**: 107, 1987。