

用改进的热休克法制备大肠杆菌碱性磷酸单酯酶

廖锦民

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

碱性磷酸单酯酶(AK_{pase})[E. C. 3.1.3.1]是专切磷酸单酯键的最常用工具酶之一,它广泛地存在于动植物组织以及微生物中。目前,从大肠杆菌中提取 AK_{pase} 有四种方法:(1)热休克法^[1];(2)渗透休克法^[2];(3)溶菌酶-EDTA 处理法;(4) pH 1.8 处理法。本文介绍一种经过改进的热休克法制备大肠杆菌 AK_{pase}。

材料和方法

(一) 菌种、培养基和缓冲液

1. 菌种: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K12。
2. 限量磷培养基: 0.08 M NaCl, 0.02 M NH₄Cl, 1mM MgCl₂, 0.2mM CaCl₂, 0.5mM ZnCl₂, 2μM FeCl₃, 0.12 M Tris-HCl, pH7.6, 0.3% 葡萄糖, 0.3% 水解乳白蛋白(oxid Ltd)。
3. DE-11 纤维素 (Whatman Biochemicals Ltd)。
4. 缓冲液 A: 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.01 M MgCl₂。
5. AK_{pase} 活力测定用缓冲液 B: 1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1mM 对硝基酚磷酸酯 (NPP)。
6. RNase 活力测定用缓冲液 C: 0.2 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.01 M MgCl₂, 1mM EDTA, 0.3% 不含无机磷的酵母 RNA。

(二) AK_{pase} 热休克制备法

1. 菌体培养和热休克处理: *E. coli* K12 接种在 4l 限量培养基中振荡培养(100 次/分), 当菌液 A₅₉₀ 达 1.10 时, 离心收集菌体, 并均匀悬浮在缓冲液 A 中(1 克湿菌体/20ml)。在 85°C 恒温水浴保温(即热休克处理)30 分钟, 迅速移置冰水中冷却 5 分钟, 离心去菌体, 上清液即为粗 AK_{pase} 酶液。

2. DE-11 纤维素柱 (1.4 × 30cm) 层析: DE-11 纤维素柱用缓冲液 A 平衡, 粗 AK_{pase} 酶液直接上样, 流速宜慢 (5ml/20 分), 上样完毕。先用缓冲液 A 洗涤, 当流出液 A₂₈₀ 下降至 0.4 时, 改用 1l 含 0—0.2 M NaCl 的缓冲液 A 进行梯度洗脱。流速 10ml/20 分, 分部收集, 合并 AK_{pase} 活力峰(图 1)。

3. DE-11 纤维素浓缩柱 (1.8 × 3.5cm): DE-11 纤维素柱用缓冲液 A 平衡, 将 DE-11 柱流出的 AK_{pase} 液用缓冲液 A 稀释 7—8 倍, 以 5ml/20 分流速吸附到柱上。用 50ml 含 1 M NaCl 的缓冲液 A 进行洗脱, 流出液中 AK_{pase} 活力高峰部分 15—20ml 收集。即为精制 AK_{pase}。

(三) AK_{pase} 活力测定

取缓冲液 B 1ml, 加入待测酶液 $n\mu$ l, 在

* RNase 活力的同系层析检测工作, 承蒙中国科学院人工合成核酸会战组陈海宝同志协助完成, 谨此致谢。

表 1 AKpase 热休克法制备流程各步骤的酶活力,比活,纯化倍数,回收率

| 步骤 | 酶单位 (u/ml) | 酶液 (ml) | 总酶单位 (u) | 酶蛋白 (mg/ml) | 比活 (u/mg) | 纯化倍数 | 回收率 (%) |
|-----------|------------|---------|----------|-------------|-----------|-------|---------|
| 对数期菌液 | 20.4 | 4000 | 81600 | 1.41 | 14.46 | 1 | 100 |
| 热休克处理 | 392 | 120 | 47040 | 4.36 | 89.9 | 6.2 | 57.6 |
| DE-11 柱分离 | 273 | 125 | 34125 | 0.21 | 1300 | 89.9 | 41.8 |
| DE-11 柱浓缩 | 1640 | 19 | 31160 | 1.00 | 1640 | 113.4 | 38.1 |

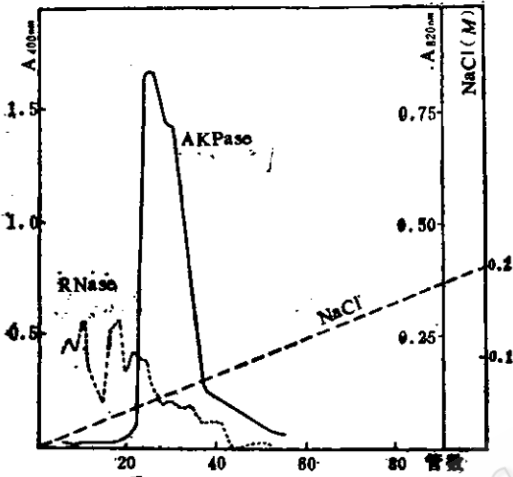


图 1 DE-11 柱 (1.4 × 30cm) AKpase 梯度洗脱图谱
 —— AKpase 酶活力 A_{400nm}
 - - - RNase 酶活力 A_{260nm}

37℃ 恒温 15 分钟后, 立即加入 2ml 0.5M K_2HPO_4 终止反应。以无酶为对照, 测 A_{400} 。按下式计算 AKpase 的酶活力单位:

$$u/ml = \frac{A_{420} \times 3 \times 4}{13.2 \times n} \times 1000 = \frac{909}{n} A_{400}$$

式中 13.2 是在 pH 8.0 时对硝基酚 (NP) 的克分子消光系数。

(四) 层析柱中的 RNase 活力测定

取缓冲液 C 0.5ml, 加入 4 μ l 层析柱分部洗脱液, 在 60℃ 恒温 15 分钟后, 迅速移置冰水中冷却 5 分钟。立即加入定磷试剂 2ml, 混匀后迅速用普通台式离心机离心 4000rpm, 取上清液继续在 60℃ 恒温 20 分钟。以无酶为对照测 A_{820} (A_{820} 为 RNase 的活力)。

(五) 产品中的 RNase 的同系层析检测法

按 Jay^[3] 方法测定。以 ^{32}P 标记 RNA 片段 $CpGpGpA_{32p}Cp$ 作为 AKpase (做成固相酶柱)

的底物。酶解 11℃, 2.5 小时后, 用 0.05 M 碳酸氢三乙胺洗脱产物, 浓缩, 脱盐后, 点样到 DEAE 微晶纤维素板上, 用同系混和物 No6 层, 最后进行放射自显影。观察 RNase 污染情况。

结 果

E. coli K12 在 41 限量磷培养基中培养可得菌体 6.5 克, 这 6.5 克菌体经热休克制备的提取流程, 各步骤所得结果见表 1:

产品 AKpase 中的 RNase 活力经同系层析检测 (图 2) 可看出, $CpGpGpA_{32p}Cp$ 经 AKpase 酶解后生成 $CpGpGpA_{32p}C$ 均一的一

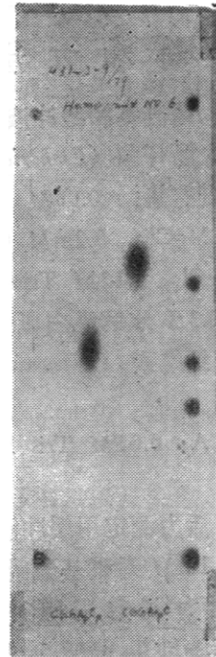


图 2 $CpGpGpA_{32p}Cp$ 经 AKpase 酶解后的同系层析图谱 [见方法(五)]

个斑点,其上方没有出现新斑点,表明产品 AK_{pase} 中没有 RNase 的明显污染。用这个方法制备 AK_{pase} 已用于人工合成酵母丙氨酸 tRNA 的工作上^[4]。

讨 论

1960年,由 A. Garen 提出热休克法制备 *E. coli* 的 AK_{pase} 的方法^[1],由于热休克后杂蛋白很多;后处理冗长繁杂,故该法多年来未得到广泛应用。通过改进,省略了原来热休克法中的超离心,透析等步骤。注意控制 DE-11 柱层析的条件。上样的 pH 以 8.0 为宜,上样液盐浓度不高于 0.02M,流速较慢。以保证 AK_{pase} 较牢固地吸附在柱上,而其他杂蛋白随洗涤液流出。这样经过 DE-11 柱的分离纯化,就可得到纯度较好的 AK_{pase}。与其他方法相比,本方法更简便快速可靠。RNase 的污染也并不明显。

E. coli K12 大量产生 AK_{pase} 的机理是:由于它处于无机磷的“饥饿”状态,这样菌体就能通过代谢调节大量产生 AK_{pase}。在限量磷培养基中并未加入无机磷,培养基中的无机磷全部来自水解乳白蛋白所含的无机磷。在实验中观察到:当水解乳白蛋白用量为 0.3% 时,菌体生长慢而少,但产生的 AK_{pase} 量却很多,而用量提高到 0.5% 时,菌体长得又快又多,但产生的 AK_{pase} 量却很少。故使用其他厂家的水解乳白蛋白时,必须测定它的无机磷含量。以保证培养基中的无机磷量不高于 $6.4\mu\text{M}/\text{l}^{[2]}$ 。

参 考 文 献

- [1] Garen, A. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **38**: 470—483, 1960.
- [2] Torriani, A. et al.: *Methods in enzymology*, Vol. 12B, p. 212—218. 1968.
- [3] Jay, F. et al.: *Nucl. Acids Res.*, **1**: 331—353. 1974.
- [4] 人工合成核酸协作组: 科学通报, **25**: 412—413. 1980.

会 议 和 信 息

中国微生物学会于 1985 年拟召开下列会议:

| 会 议 名 称 | 主持会议的专业委员会 | 时 间 |
|---------------------|-------------|---------|
| 第四届理事会第二次会议 | 学会 | 5 月 |
| 应用微生物生态学学术讨论会 | 学会、生态学会 | 10 月 |
| 酶工程学术讨论会 | 工业与发酵学会生化学会 | 5 月 |
| 疫苗和医药制造的基因工程讨论会 | 分子微生物学及生物工程 | 10 月 |
| 细菌和抗感染免疫学术讨论会 | 医学及免疫学 | 11 月 |
| 气相色谱在微生物学中应用讨论会 | 基础 | 10 月 |
| 第三届正常菌群学术讨论会 | 人兽共患病 | 10—11 月 |
| 第二届真菌毒素、中毒症与致癌学术讨论会 | 真菌 | 10 月 |
| 第五届干扰素学术讨论会 | 病毒 | 10 月 |
| 分子病毒学方法交流会 | 病毒 | 9 月 |
| 自养菌学术讨论会 | 基础 | 5 月 |
| 食用菌育种及品质改良学术讨论会 | 农业 | 未定 |
| 杀虫微生物学术讨论会 | 农业 | 未定 |
| 酱腌菜加工过程中微生物作用讨论会 | 酿造学会 | 未定 |

今后,学会拟在这些会议上加强信息交流,既加强学术思想的交流,也加强科研成果的交流。为此,在举行上述会议的同时,也举办科技商品市场。市场上可进行两类商品交易:

(一) 产品交易: 各厂家生产与微生物学有关的用于生产、教学、科研的用品,如仪器、药品、培养基、标准品、标本等可在会议上展销,同时也征求使用者对产品的改进意见和对新产品的要求。

(二) 科研成果交易: 科研人员可在会议上展示其成果,说明其功能,与使用成果单位洽谈科技成果转让。同时,在经

济建设和国防建设方面有哪些微生物学问题需要解决,也可在会议上提出,与能够承担的单位进行洽谈、委托。或在会议期间组织几个单位共同协商进行某项科研课题。

中国微生物学会设有九个专业委员会和酿造学会,其业务范围涉及纺织、轻工、酶制剂、食品制造、酿造、食品检测、化工、材料防腐、金属腐蚀、能源、饲料、根瘤菌剂、微生物杀虫剂、植物病害、医药制造、卫生检测和环境保护等方面。学会希望通过各种活动,成为沟通科研和生产的桥梁。

中国微生物学会办公室