

多核苷酸磷酸化酶(PNP_{ase})的提取研究

浙江医科大学基因工程研究室 韩晓旭

摘 要 用溶菌酶·超声波法处理大肠杆菌使其破壁。用聚丙烯酰胺凝胶电泳对纯化的PNP_{ase}定性,再根据PNP_{ase}的活力测定及poly I的聚合情况,对PNP_{ase}的质量进行综合评价。

聚肌胞是我国近年来开发的一种抗病毒新药,其主要的药理作用是诱导体内生成干扰素,从而干扰病毒的复制,达到治疗目的。聚肌胞的两条互补链为poly I和poly C,此两条链在人工合成时,均需PNP_{ase}进行催化反应。因此,PNP_{ase}的纯度和催化活性,是聚肌胞生产中的关键步骤。

PNP_{ase}是来自大肠杆菌的胞内酶,国内几家生产聚肌胞的药厂在制备PNP_{ase}时,多采用手工研磨或电动细菌磨破菌^[1]。这些方法在破碎大肠杆菌时,均需添加玻璃砂或其它添料,致使物料的离心处理量大、操作笨重繁琐,最后纯化过的酶活单位也不够稳定。本文报道的溶菌酶·超声波法,省掉了笨重的电动细菌磨,提高了PNP_{ase}的稳定性。

材料和方法

一、破菌及提酶

从低温冰箱中取出一定数量的冷冻大肠杆菌菌体,4℃融化后,按菌体量的2倍(W/V)加入TE缓冲液(0.02M Tris-HCl, pH8.0, 0.001 M EDTA)混悬菌体,再按每克菌体加入10毫克溶菌酶的比例加入溶菌酶(上海东风生化试剂厂产品),搅拌混匀后,0℃冰浴30分钟。溶菌酶处理后,用CPS-1A型超声波粉碎仪(上海超声波仪器厂产品)处理上述菌体混悬液(10秒×10次)。

超声处理后,补加1倍菌体体积的TE缓冲液,然后于4℃离心(14000 rpm×20分钟)。灰白色的沉淀为菌体碎片和杂质,淡黄色透明之上清液即为PNP_{ase}粗提液。

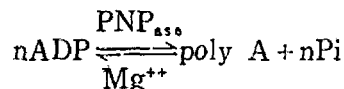
PNP_{ase}粗提液经15%的硫酸链霉素处理而除去核蛋白,经35%饱和度硫酸铵盐析而除去杂蛋白,再经60%饱和度硫酸铵沉淀出PNP_{ase}粗酶。将此粗酶液再经DEAE-纤维素柱层析,即可分离到符合聚肌胞生产所需的、相对的PNP_{ase}纯品。

二、聚丙烯酰胺凝胶电泳

按文献方法进行^[3]。

三、PNP_{ase}的活力测定

本实验采用液相酶反应系统中的聚腺苷酸(poly A)法进行活力测定^{[2][1]}。其原理是:腺苷二磷酸(ADP)作为PNP_{ase}的底物,在Mg⁺⁺的激活下,酶促合成poly A。单位时间内生成的poly A越多,则PNP_{ase}的酶活力也越高。其反应式表示如下:



PNP_{ase}酶活单位的定义为:于37℃进行反应的液相酶系统中,在反应30分钟时生成的poly A量的光密度(A_{257 nm})为0.1时,即为一个活力单位。

四、poly I的酶促合成

本试验采用液相酶聚合法,即在Mg⁺⁺

的激活下, PNP_{ase} 能将作为底物的肌苷二磷酸(IDP)聚合为 poly I。在反应的不同时间内, 分别取样测反应物的减色效应。与此同时, 取不同时间的反应液做纸电泳检测, 根据电泳图谱作 poly I 聚合情况的判定。

结果和讨论

一、溶菌酶是糖苷水解酶, 能水解细胞壁主要成份肽聚糖的 β -1,4 糖苷键, 因而具有溶解细胞壁的作用。在溶菌酶处理大肠杆菌后, 再用超声波作用于菌体, 就能更容易地将菌体破碎, 存在于大肠杆菌内的 PNP_{ase} 能全部被释放出。所进行的三批试验, 在破菌后, 用紫外分光光度法测定时, 每毫升粗酶液的蛋白含量均达到 100 至 120 毫克的较高水平。用电动细菌磨破菌后, 再用 DEAE·纤维素柱层析纯化 PNP_{ase} 时, 其酶活部分有时出现在 0.23 N NaCl 洗脱液中, 有时则出现在 0.23 N NaCl 和 0.35 N NaCl 两者的洗脱液中, 分散了酶活部分并导致酶活单位不高。而溶菌酶·超声波法破菌后, 再用 DEAE·纤维素柱层析纯化 PNP_{ase} 时, 其酶活部分全部集中在 0.35 N NaCl 的洗脱部分中, 使得收集方便, 酶活单位高(图 1)。

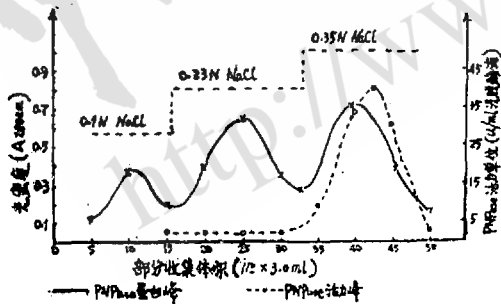


图1 溶菌酶·超声波法破菌后 DEAE·纤维素柱层析示意图(示 PNP_{ase} 的蛋白峰及酶活峰的关系)

二、PNP_{ase} 由三个相同的亚基分子组成, 每个亚基的分子量为 84000 道尔顿, 因此其整个分子的分子量是比较大的^{[6][4]}。在浓度为 7.5% 的聚丙烯酰胺凝胶中, PNP_{ase}

分子的 R_f 值 = 0, 与对照的标准品区带同位。由于考马斯亮兰 R-250 染色液的灵敏度很高, 本实验染出的杂蛋白分子的区带数较其它染色法为多(8 至 10 条带)。尽管如次, 从 PNP_{ase} 的活力测定以及 poly I 的聚合情况看, 此酶质量仍然达到了原工艺的提取水平。

三、经用 poly A 法测定用溶菌酶, 超声波法破菌后纯化的 PNP_{ase} 有比较高的活力单位, 三批小试的测活结果分别为 20、40 和 32 单位/ml, 达到了原工艺破菌提酶时的酶活单位^[1]。

四、利用三批 PNP_{ase}, 共进行了三次 poly I 聚合试验。无论哪批 PNP_{ase}, 在反应 2 至 4 小时内, 均有明显的减色效应, 说明 PNP_{ase} 能迅速催化 IDP 合成 poly I。4 至 5 小时的反应使减色效应及合成产物的转化率达到最大(40%)。然后, 由于 poly I 降解, 又使增色效应迅速增加。控制 Mg⁺⁺ 浓度和反应时间并及时终止聚合反应, 可获得较高转化率和较大分子量的聚合产物^[2], 同样也达到了原电动细菌磨破菌而提取的 PNP_{ase} 的聚合水平。在 0、2、4、6 以及 20 小时的反应液取样中, 均在纸电泳中检测出明显的 poly I 聚合物、未聚合底物以及聚合后的再次降解物, 同时也可看出聚合物的分子量较大。这些结果均证明了 PNP_{ase} 的催化活力很强(图 2 和图 3)。

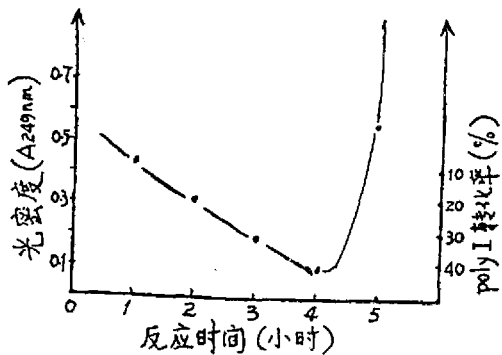


图2 溶菌酶·超声波法破菌提酶后 PNP_{ase} 催化 poly I 的反应中减色效应及转化率曲线

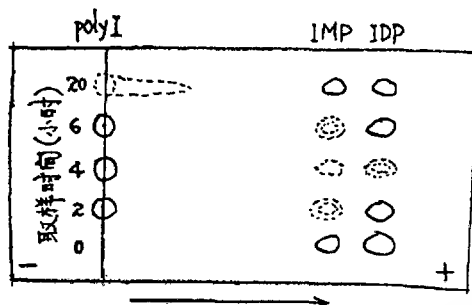


图3 溶菌酶·超声波法破菌提酶后PNP_{ase}催化poly I反应中纸电泳检测图谱

参 考 文 献

- [1] 韩晓旭等,《浙江药学》,1984, No 1
- [2] 靳传富等,《生物化学与生物物理进展》, (4) 25, 1975
- [3] 张龙翔等,《生化实验方法和技术》,人民教育出版社,1981
- [4] Evans, S. M. et al: Cloning and characterization of the genes for PNP_{ase} and ribosomal protein S15 in *E. coli* (Univ. British Columbia, Vancouver, Bc Can.) 1984
- [5] Regnier, P. et al: *J. Biol. Chem.* 1987, 262(1), 63—8

Study of Polynucleotide Phosphorylase (PNPase) Extracted by Lysozyme-Ultrasonication

Han Xiaoxu

(Department of Biochemistry Zhejiang Medical University, Hangzhou)

Abstract

PNPase was extracted by lysozyme-ultrasonication from *E. coli*. In order to determine the nature and quantity of PNPase, PAGE, activity determination of PNPase and enzymatic synthesis of poly I were carried out. The results indicated that PNPase extracted by lysozyme-ultrasonication had good activity and strong enzymatic synthetic ability. The methods can replace heavy electric bacterial mill in the production of poly I:C.