

Phage Ghost 로 破裂시킨 *E. coli* 에서 Glucose-6-phosphate Dehydrogenase 의 活性度 測定

公州師範大學 化學科

尹 世 重

(1968. 2. 27. 受理)

Assay of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in *E. coli* Cells Ruptured by Phage Ghost

by

SE-JOONG YUN

Department of Chemistry,

Kongju Teacher's College, Kongju

(Received February 27, 1968)

ABSTRACT

The relative activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *E. coli* was measured at 340 $m\mu$ with a spectrophotometer. The synchronized *E. coli* cells in exponential phase were treated with Phage(T_2) ghost, and used as a enzyme solution directly. This assay method supposed to be useful for the continuous determination of enzyme activity in *E. coli*.

序 論

Glucose-6-phosphate dehydrogenase 의 一般 定量法 은 이미 알려져 있는 事實이지만⁽¹⁾, *E. coli* 細胞들을 Phage(T_2) ghost 로 處理하여 分離精製하지 않은 現

탁액에서 直接 glucose-6-phosphate dehydrogenase 의 活性度를 測定하는 方法은 *E. coli* 의 成長과 함께 連續적으로 活性度を 測定할 수 있는 것이므로 代謝調節과 같은 生物化學的 現象을 다루는데 効率的이다. 이 實驗에서는 synchronize 된 *E. coli* 의 exponential phase 에서 glucose-6-phosphate dehydrogenase 의 活性도를

連續적으로 測定할 수 있는 範圍 안에서 比較測定했다.

實 驗

1. E. coli의 培養

표 1과 같은 培養液 1l에 冷所에 保管한 E. coli를 少量(1 loop) 接種하여 37°C에서 培養하면 1~2時間 後에 exponential phase의 상태로 된다. 培養하는 동안 充分한 空氣를 불어넣기 爲해서 繼續 저어 주었다.

Table 1. Cultivation medium for E. coli

Component	Final conc.	To be used for 1l
Na ₂ HPO ₄ ·anhy.	0.115M	16.4g
KH ₂ PO ₄ ·anhy.	0.011M	1.5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.015M	2.0g
MgSO ₄	8.08 × 10 ⁻⁴ M	96mg
CaCl ₂	9 × 10 ⁻⁵	10mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.8 × 10 ⁻⁶ M	0.5mg
HCl-conc.	6 × 10 ⁻³ M	0.5ml

0.1~0.2 g% glucose, pH 7.4

2. Bacterial phage(T₂) ghost의 製法

冷所에 保管한 phage(T₂) 1ml를 滅菌한 37°C의 3M Na₂SO₄ 溶液 2ml에 加하여 約 2分間 저어서 混合했다. 그중 2ml를 채반리 分取하여 滅菌한 37°C의 蒸溜水 100ml에 加하여 約 10分間 저어 주었다.

3. E. coli의 處理

E. coli 培養液과 phage ghost를 1:4의 比率로 섞어서 37°C에서 約 30分間 저어 주면 Kletts OD가 10程度로 떨어진다. 그 以上 저어주면 酵素의 活性度를 減少시키는 結果가 되었다.

4. 活性度 測定

이 實驗에서 使用한 glucose-6-phosphate은 Nutritional Biochemical Corporation에서 나온 Ba鹽을 約 5倍量의 0.1N HCl에 녹여, Na₂SO₄ 飽和溶液으로 處理한 다음, pH를 7.8로 調節하여 基質溶液으로 使用했다.

TPN⁺(⁶)은 Sigma 會社의 98% 試藥이며, NaOH로 中和시켜(pH 7) 使用했다. Tris buffer(pH 7.8)를 使用하여 Mg⁺⁺ 存在下에 340m μ 에서 Gilford UV spec-

trophotometer로 活性度를 測定했다. Enzyme system은 Kletts OD가 40에서 240에 이르기 까지의 E. coli 培養液을 phage ghost로 處理하여 만들었다.

5. 豫備 實驗

培養液 1l中的 E. coli를 International Universal Cooling Centrifuge로 3,700~4,000 rpm.에서 10分間 遠心分離하여 모았다. 1g의 細胞를 10ml의 tris buffer(pH 7.8)에 넣어 震盪시킨 다음 10KC ultrasonic oscillator에 依해서 隔 5分씩 15分間 破裂시켰다. 破裂液 10ml에 0.1ml의 核酸分解酵素인 DNA-ase와 RN A-ase의 混合液(2mg/ml)을 加하여 室溫에서 約 10分間 處理하고, 7,000 rpm.에서 10分間 遠心分離하여 DNA와 RNA를 除去시킨 다음, 이 上澄液에 tris buffer(pH 7.8), 0.001M EDTA 溶液 3l에 0.07 ml mercaptoethanol을 加하여 冷所에서 하루밤을 保管한 溶液속에서 約 10時間동안, 위에서 處理한 液을 dialysis하여 이를 酵素液으로 하였다. Enzyme의 濃度에 따른 活性度, TPN⁺의 濃度에 따른 活性度, 및 基質의 濃度에 따른 活性度를 各各 測定하였다.

結果와 檢討

그림 1에서 그림 3까지는 豫備實驗에서 얻은 結果이며, 그림 4는 phage ghost로 處理하여 얻은 酵素 濃度에 따른 活性度를 나타낸 것이다.

E. coli의 培養速度는 營養과도 有關하지만, 酸素의 供給量에도 많이 달려 있다. E. coli를 遠心分離하여 酵素液으로 만들때까지의 모든 操作은 冷却된 條件에서 處理되어야 한다는것은 勿論이다. 約 10時間에 걸쳐 dialysis하는 동안 少量의 mercaptoethanol或은 glutathione이 酵素의 安定에 도움을 주는데 cysteine도 有効하다.

Na₂SO₄로 처리하여 만든 phage ghost는 冷所에 保管했을때, 製造後 2日부터 2週日間이 活性度가 가장 크다.

酵素液中에서 TPNH oxidase 및 DPNH oxidase의 存在가 確認되지만 TPN⁺→TPNH system에서는 TPNH의 初濃度가 매우 작으므로 그의 作用에 依한 酸化反應은 全活性度의 比較測定에서 無視했다.

그러나 malic dehydrogenase의 活性度 測定の 경우 oxaloacetate를 基質로 했을때, DPNH의 初濃度가 比較的 크므로 DPNH oxidase의 存在가 無視되지 않는다. 그림 1에 依하면 E. coli中的 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 K_m值가 대략 5.0 × 10⁻⁶M임을 가리키고 있다.

(註) TPN⁺은 NADP, DPN⁺은 NAD, 또한 이들의 환원형인 TPNH는 NADPH, DPNH는 NADH로 쓸 수도 있지만, 이 論文에서는 從來의 記述法에 따르기로 했다.

TPN⁺: Triphosphopyridine nucleotide

DPN⁺: Diphosphopyridine nucleotide

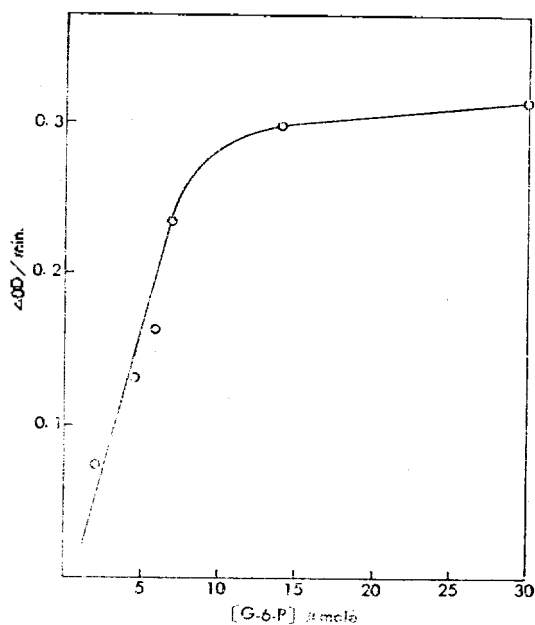


Figure 1. Effect of substrate concentration on relative activity of G-6-P dehydrogenase in *E. coli*. The reaction mixture contained 0.04 ml of enzyme solution, 60 μmole of tris buffer (pH 7.8), 10 μmole of Mg^{++} , and 0.16 mmole of TPN^+ in a total volume of 1ml. The reaction mixture was placed in cuvettes of 1 cm light path and the optical density at 340 μ was measured with a Gilford UV spectrophotometer.

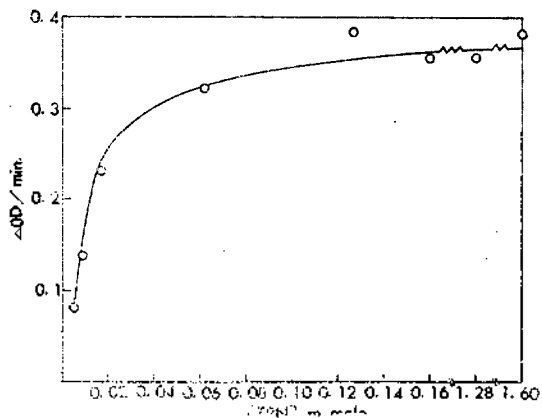


Figure 2. Effect of TPN^+ concentration on relative activity of G-6-P dehydrogenase in *E. coli*. The reaction mixture contained 30 μmole of glucose-6-phosphate, 60 μmole tris buffer (pH 7.8), 10 μmole of Mg^{++} , and 0.04 ml of enzyme in total volume of 1ml. The optical density at 340 μ was measured with a Gilford UV spectrophotometer.

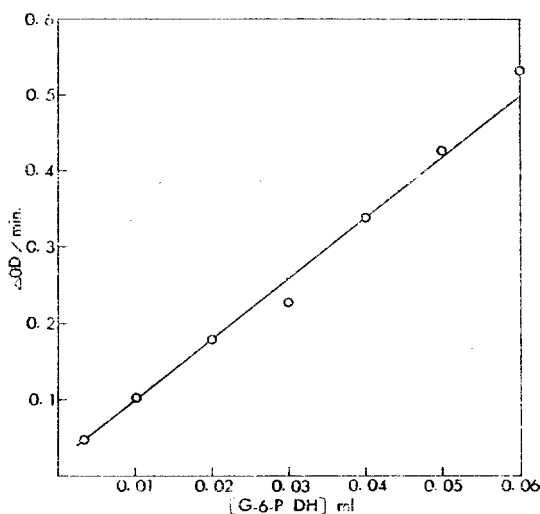


Figure 3. Effect of enzyme concentration on relative activity of G-6-P dehydrogenase in *E. coli*. The reaction mixture contained 30 μmole of glucose-6-phosphate, 60 μmole of tris buffer (pH 7.8), 10 μmole of Mg^{++} , and 0.16 mmole of TPN^+ . The optical density at 340 μ was measured with a Gilford UV spectrophotometer.

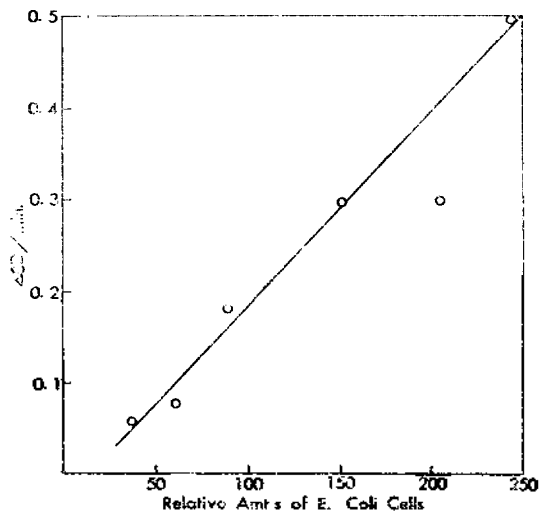


Figure 4. Effect of enzyme concentration on relative activity of G-6-P dehydrogenase in *E. coli*. The enzyme solution was prepared by means of treatment of *E. coli* cells with phage ghost. The reaction mixture contained 0.6 ml of each enzyme preparations, 20 μmole of tris buffer (pH 7.8), 6 μmole of Mg^{++} , 0.1 mmole of TPN^+ , and 1 μmole of glucose-6-phosphate in a total volume of 1ml. The optical density at 340 μ was measured with a Gilford UV spectrophotometer.

引用文獻

- (1) R. H. Thomson and J. R. Todd, *Nature*, **201**, 718 (1964).
- (2) Monique Marquet, *Compt. Rend*, **259**, 3128 (1964).
- (3) H. B. Collies and M. W. Grog, *Can. J. Biochem.*, **43**, 105 (1965).
- (4) J. Strominger and O. H. Lowry, *J. Biochem.*, **213**, 635 (1955).
- (5) O. Warburg and W. Christian, *Biochem. Z.*, **303**, 40 (1939).
- (6) Kubowitz, F. and Ott, P., *Biochem. Z.*, **314**, 94 (1943).
- (7) Yoshida and Ernst Freese, *Biochem. Biophys. Acta*, **99**, 56 (1965).
- (8) *ibid*, **92**, 33 (1964).
- (9) R. Bennett, D. R. Tayler and A. Hurst, *Biochem. Biophys. Acta*, **118**, 512 (1966).
- (10) James D. Watson, *Molecular Biology of the Gene*, **7** (1965).