

灰色链霉菌胰蛋白酶在变铅青链霉菌中的异源表达及酶学性质分析

马腾博^{1,2}, 令桢民^{1,2}, 康振^{1,2}, 李江华^{1,2}, 堵国成^{3,4}, 陈坚^{1,4}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

4 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

马腾博, 令桢民, 康振, 等. 灰色链霉菌胰蛋白酶在变铅青链霉菌中的异源表达及酶学性质分析. 生物工程学报, 2013, 29(4): 466-479.

Ma TB, Ling ZM, Kang Z, et al. Heterologous expression and enzymatic analysis of *Streptomyces griseus* trypsin in *Streptomyces lividans*. Chin J Biotech, 2013, 29(4): 466-479.

摘 要: 胰蛋白酶作为一种重要的丝氨酸蛋白酶被广泛应用于食品、医药和皮革等工业领域。本文成功实现了灰色链霉菌来源的胰蛋白酶编码基因在变铅青链霉菌中的高效活性表达, 并对其酶学性质进行分析比较。以灰色链霉菌 ATCC10137 基因组为模板, 获得胰蛋白酶编码基因 *sprT* 并克隆至表达质粒 pIJ86, 成功构建了重组链霉菌工程菌 TK24/pIJ86-*sprT*。以 R2YE 和 SELF 为发酵培养基, 最高酶活分别达 9.21 U/mL 和 8.61 U/mL。酶学性质分析表明, 和牛胰蛋白酶 (BT) 相比, 重组链霉菌胰蛋白酶 (rSGT) 的耐酸能力强, 具有较广的 pH; 且 rSGT 对酰胺键具有更高的特异性; 此外, Zn^{2+} 和有机溶剂分别对 rSGT 的酯酶活力和酰胺酶活力具有促进作用; 本研究结果为 rSGT 的性质改造以及工业应用提供了依据。

关键词: 灰色链霉菌, 变铅青链霉菌, 胰蛋白酶, 酶学性质, 发酵培养基

Received: October 8, 2012; **Accepted:** December 3, 2012

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA100905), Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT1135), Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, Independent Innovation Program of Jiangnan University (No. JUSRP111A23).

Corresponding author: Zhen Kang. Tel: +86-510-85329031; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA100905), 教育部长江学者和创新团队发展计划 (No. IRT1135), 江苏省优势学科项目, 江南大学自主科研计划项目 (No. JUSRP111A23) 资助。

Heterologous expression and enzymatic analysis of *Streptomyces griseus* trypsin in *Streptomyces lividans*

Tengbo Ma^{1,2}, Zhenmin Ling^{1,2}, Zhen Kang^{1,2}, Jianghua Li^{1,2}, Guocheng Du^{3,4}, and Jian Chen^{1,4}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

³ Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

⁴ National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Trypsin as an important serine protease has been widely used in food, pharmaceutical and tanning industries. In this study, we successfully expressed trypsin (cloning from *Streptomyces griseus* ATCC10137) in *Streptomyces lividans* TK24 and comparatively investigated its enzymatic properties. Specifically, applying *S. griseus* ATCC 10137 genome as template, we obtained the *sprT* gene and sub-cloned it into the expression plasmid pIJ86, generating the recombinant strain *S. lividans* TK24/pIJ86-*sprT*. When cultivated in R2YE and SELF, the activity of rSGT reached 9.21 U/mL and 8.61 U/mL, respectively. Meanwhile, the results of the enzymatic analysis showed that rSGT exhibited a higher acid tolerance and a higher specificity to hydrolyze amide bonds compared with bovine trypsin (BT). In addition, Zn²⁺ and organic solvents up-regulated esterase and amidase of rSGT. Taken together, the results obtained herein provide meaningful information for further modification of rSGT and its industrial application.

Keywords: *Streptomyces griseus*, *Streptomyces lividans*, trypsin, enzymatic properties, fermentation media

胰蛋白酶 (Trypsin, EC 3.4.21.4) 属于丝氨酸蛋白酶类, 是一种通过专一作用于精氨酸和赖氨酸所形成的肽键来催化蛋白质水解的碱性蛋白酶。其最初是从牛胰腺泡中提取得到, 后被发现广泛存在于猪、狗、鼠等哺乳动物、昆虫和海洋生物中^[1]。目前, 哺乳动物胰蛋白酶, 尤其是牛胰蛋白酶, 被广泛应用于诸多工业领域。Wahlby 等在链霉菌中发现了胰蛋白酶, 尤其以灰色链霉菌中胰蛋白酶的研究最为深入^[2-4]。链霉菌源胰蛋白酶同哺乳动物胰蛋白酶具有高度同源性且作用机理相似^[5], 但因其成分相对单一, 作用条件温和, 纯化工艺简单而受到越来越多研究者的关注。

灰色链霉菌胰蛋白酶 (SGT) 由 *sprT* 基因

(GenBank Accession No. M64471) 编码, 其氨基酸序列由信号肽 (32 个氨基酸)、前导序列 (4 个氨基酸) 和成熟酶 (223 个氨基酸) 三部分组成^[6]。它是以无活性的酶原前体的形式合成、储存以及分泌的, 和哺乳动物胰蛋白酶不同, SGT 的分泌不需要外源激酶的切割, 而是通过自催化作用产生有活性的成熟酶^[6-7]。关于 SGT 野生酶的报道较早, 但一直集中在酶学特性上, 对产量的研究较少。Robert 等在 1975 年就对其酶学和物理化学性质进行了研究^[8], SGT 的晶体结构也得到了进一步的阐释^[9], 并被广泛用作研究酶学动力学的模型。*sprT* 基因 GC 含量高达 74%, 具有严重的密码子偏好性, 在翻译过程中需要形成 3 对二硫键, 因此其活性表达存在一定难度。在

SGT 异源表达方面, 国内外报道较少, Page 等将 *sprT* 成熟酶基因连接在 pWB980 载体上, 以枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* WB700 为宿主实现了其异源表达^[10]。Kim 等以变铅青链霉菌 *Streptomyces lividans* 为宿主也实现了 *sprT* 基因的异源表达^[11], 但酶活相对较低, 其表达以 pWHM3 为载体, 采用 *sprT* 自身启动子, 强度较弱。我们曾尝试以大肠杆菌 *Escherichia coli* 和 *B. subtilis* 为宿主表达, 结果都产生无活性包涵体。链霉菌宿主具有良好的生物安全性, 同时能够解决重组胰蛋白酶限制修饰、酶原切割以及对宿主毒性的问题^[12-13]。因此, 本研究选用红霉素抗性基因启动子, 以 *S. lividans* 为宿主, 实现了胰蛋白酶的高效表达, 并对重组酶学性质进行了系统的比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

灰色链霉菌 *Streptomyces griseus* ATCC

10137 来自美国典型菌种收藏所, 变铅青链霉菌 *Streptomyces lividans* TK24、大肠-链霉菌的穿梭载体 pIJ86 均来自英国 John Innes 研究所, 克隆质粒 pMD18-T simple vector 从 TaKaRa 公司购置。

1.1.2 培养基与抗生素

大肠杆菌采用 LB 培养基, 培养时加入 100 µg/mL 氨苄青霉素。变铅青链霉菌 TK24 液体生长培养基 (YEME)、原生质体转化培养基 (R5)、固体平板生长培养基 (MS) 配制方法参照文献[14], 重组变铅青链霉菌发酵培养基 (XSH、C5^[15]、R2YE^[14]、TSB^[14]、SELF) 配制方法见表 1, 重组变铅青链霉菌培养时加入 50 µg/mL 安普霉素 (Apramycin)。

1.1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Sph* I 和 *Bgl* II、Solution I 连接酶、DNA 标准分子量、DNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品。PCR 产物纯化试剂盒为上海生工生物技术有限公司产品。质粒提取试剂盒为博凯思维公司产品。蛋白质分子量标准和考马斯亮蓝蛋白浓度测定试剂盒为碧云天公司产品。其

表 1 重组链霉菌发酵培养基的组成

Table 1 Composition of media for fermentation of recombinant strain

XSH (g/L)		C5 (g/L)		R2YE (/L)		SELF (g/L)		TSB (g/L)	
Glycerin	20	Glucose	12	Sucrose	103 g	Glucose	10	TSB	30
Peptone	20	Yeast extract	5	K ₂ SO ₄	0.25 g	Peptone	5		
Yeast extract	5	CaCO ₃	8	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.1 g	Yeast extract	5		
K ₂ HPO ₄	2	NaCl	5	Glucose	10.0 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5		
KH ₂ PO ₄	2			Casamino acid	0.1 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5		
MgSO ₄	2			Yeast extract	5.0 g	Casamino acid	1		
CaCl ₂	1			KH ₂ PO ₄ (5%)	10 mL				
				CaCl ₂ ·2H ₂ O (3.68%)	80 mL				
				L-proline (20%)	15 mL				
				TES (5.73%, pH 7.2)	100 mL				
				Trace element	2 mL				
				NaOH (1 mol/L)	5 mL				

余药品均为进口或国产分析纯化学试剂。本研究使用的主要仪器有: AKTA FPLC 蛋白纯化系统 (Aamersham pharmacia biotech); PCR 仪 (Techne 公司); SDS-PAGE 系统 (Aamersham pharmacia biotech); UV-2450 光谱分光光度计 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan); Hitrap benzamidine FF 纯化柱 (GE Healthcare)。

1.2 基因操作

1.2.1 *S. griseus* 胰蛋白酶基因 *sprT* 的克隆

提取 *S. griseus* ATCC 10137 基因组, 根据 NCBI 公布 ATCC 10137 胰蛋白酶 CDS 区基因序列 (*sprT*), 分别以其 5' 和 3' 端设计正反引物序列 (表 2), 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 其上下游引物分别加入 *Sph* I 和 *Bgl* II 酶切位点 (下划线标示)。PCR 反应的总体积为 50 μ L, 以 1 μ L 的灰色链霉菌基因组为模板 PCR 扩增得到目的基因 *sprT*。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.2 表达载体的构建

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收, 采用 TaKaRa 公司 PCR 产物纯化试剂盒 (操作见试剂盒说明书) 纯化后连接 pMD18-T Simple Vector, 转入大肠杆菌 JM109 中, 提取重组质粒 pMD18-T-*sprT* 并用 *Sph* I、*Bgl* II 双酶切, 经

0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收、纯化后, 用 Solution I 连接到同样经过 *Sph* I、*Bgl* II 双酶切的 pIJ86 质粒上, 构建重组表达载体 pIJ86-*sprT*。转化后提取质粒经 PCR 和双酶切鉴定, 筛选阳性克隆进行测序分析。

1.2.3 重组 *S. lividans* TK24/pIJ86-*sprT* 的构建

将穿梭质粒 pIJ86 和重组穿梭质粒 pIJ86-*sprT* 转化 *S. lividans* TK24 原生质体, TK24 原生质体的制备与 DNA 转化参照 Hopwood 等链霉菌遗传实验手册^[14]。转化后涂布 R5 再生固体培养基平板, 培养 24 h 后在平板表面均匀添加 50 μ g/mL 的安普霉素, 培养 48 h 筛选得到阳性菌落, 挑选阳性转化子划线转接 MS 固体培养基, 得到重组菌株 TK24/pIJ86 和 TK24/pIJ86-*sprT*。

1.3 重组胰蛋白酶在 *S. lividans* TK24 中表达

分别将重组菌株 TK24/pIJ86 和 TK24/pIJ86-*sprT* 链霉菌孢子接种于 100 mL 含有安普霉素 (50 μ g/mL) 的种子培养基 R2YE 中, 于 30 $^{\circ}$ C 摇床 (转速 200 r/min) 培养 24 h 后, 按 5% 的接种量转接 50 mL 链霉菌发酵培养基 XSH (50 μ g/mL 安普霉素, 放置 2 个枪头用于搅拌), 30 $^{\circ}$ C 摇床 (转速 200 r/min) 培养。发酵第 3 天开始取样, 之后每两天取样, 采用 BAPNA 法测定酶活。样品处理后经 SDS-PAGE 检测, 聚丙烯酰胺凝胶采用碧云天蛋白电泳试剂制备。

1.4 产酶发酵培养基的优化

将筛选出的重组菌株 TK24/pIJ86-*sprT* 均匀涂布在 MS 固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 d, 对菌株进行活化, 使其处于良好的生长状态, 将活化后的重组菌株的孢子接种至种子培养基 R2YE (50 mL/250 mL) 中, 200 r/min、30 $^{\circ}$ C 培养 24 h

表 2 克隆目的基因 *sprT* 的引物

Table 2 Primers for cloning of target genes

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Psb1	ACATGCATGCTGGTGAAGCACTTCCTGCGTGCG
Psb2	GAAGATCTTCAGAGCGTGCGGGCGG

The underlined part is the restriction sites.

后,以5%的接种量转接不同的发酵培养基R2YE、SELF、C5、TSB(50 mL/500 mL),第3天开始取样,之后每两天取样,采用BAPNA法测定酶活。

1.5 酶活测定

1.5.1 BAPNA 测定法

参考文献[16]的方法进行测定:N-苯甲酰-DL-精氨酸-硝基苯胺(BAPNA)是一种含有酰胺键的合成物,胰蛋白酶对酰胺键有专一的水解能力,因此BAPNA测定法是一种通过检测胰蛋白酶对酰胺键的消化情况来测定胰蛋白酶活力的方法。底物为890 μ L反应缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol/L CaCl_2)与10 μ L BAPNA(100 mmol/L)的混合物,将此底物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下预热5 min后,加入100 μ L酶液迅速混合均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2 min,测其在410 nm处吸光值的变化情况。在上述条件下,每分钟 A_{410} 升高0.1为一个酶活。胰蛋白酶酰胺键水解活力计算公式如下:

$$\text{BAPNA unit (U/mL)} = \frac{\Delta A_{410}/\text{min} \times \text{稀释倍数}}{0.1} \quad (1)$$

1.5.2 BAEE 测定法

参考文献[16]的方法进行测定:N-苯甲酰-L-精氨酸盐酸乙酯是一种含有酯键的合成物,胰蛋白酶能够专一地水解酯键,BAEE测定法就是一种通过酯键的水解来检测吸光值的变化从而计算出胰蛋白酶活力的方法。底物为3 mL BAEE缓冲溶液(67 mmol/L的磷酸钠缓冲液, pH 7.6, 0.25 mmol/L BAEE),将此底物在25 $^{\circ}\text{C}$ 预热5 min后,加入200 μ L酶液迅速混合均匀,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应2 min,测其在253 nm处吸光值的变化情况。在上述条件下,每分钟 A_{253} 升高0.001为一个酶活。

胰蛋白酶酯键水解活力计算公式如下:

$$\text{BAEE unit (U/mL)} = \frac{\Delta A_{253}/\text{min} \times \text{稀释倍数}}{0.001 \times 0.2} \quad (2)$$

1.6 重组胰蛋白酶的分离与纯化

参照文献[16]和[17]的方法:取500 mL重组菌株发酵产物,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min离心10 min,将所得发酵上清液用0.22 μ m的PVDF水膜过滤后,流经Hitrap benzamidine FF纯化柱(Φ 1.6 cm \times 2.5 cm, CN17-5144-01, GE公司),先用缓冲液A(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl)洗去未特异结合于柱上的杂蛋白,再用缓冲液B(50 mmol/L 甘氨酸, 10 mmol/L HCl, pH 3.0)洗脱,收集洗脱下来的色谱峰,得到纯化后样品。12% SDS-PAGE分析纯化后样品条带,考马斯亮蓝试剂盒(碧云天P0006)测定纯化后蛋白浓度。

1.7 重组胰蛋白酶 rSGT 与牛胰蛋白酶 BT 的酶学性质比较

1.7.1 rSGT 和 BT 最适温度及温度稳定性比较

选用BAPNA测定法,在不同温度条件下(10 $^{\circ}\text{C}$ ~70 $^{\circ}\text{C}$)分别测定rSGT和BT活力;将纯化后的rSGT和BT纯酶液分别在不同温度下保温不同的时间(10、20、30、40、50、60 min),检测剩余的酶活力。

1.7.2 rSGT 和 BT 最适 pH 及 pH 稳定性比较

选用BAPNA测定法,在不同pH反应条件下(pH 3.0~12.0)分别测定rSGT和BT的活力;将纯化后的rSGT和BT纯酶液分别在不同pH值的缓冲液中37 $^{\circ}\text{C}$ 保温1 h,检测剩余的酶活力。

1.7.3 rSGT 和 BT 酶反应动力学参数比较

选用BAPNA测定法和BAEE测定法,分别选择合适的底物浓度,以系列稀释的底物溶液测定酶动力曲线,根据双倒数作图法求得在两种底

物反应条件下 rSGT 和 BT 的 K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 数值。

1.7.4 金属离子对 rSGT 和 BT 活力的影响比较

分别在 BAPNA 和 BAEE 两种底物的反应体系中加入不同浓度的金属离子,使 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的最终浓度为 1 mmol/L,其余金属离子的终浓度为 0.5 mmol/L,以不加金属离子的反应体系的酶活定义 100%,在两种底物反应条件下分别测定加入金属离子后各反应体系中 rSGT 和 BT 的相对酶活。

1.7.5 抑制剂和有机溶剂对 rSGT 和 BT 活力的影响比较

在两种底物和酶的反应体系中,分别加入不同的蛋白抑制剂和有机溶剂,以不加任何蛋白抑

制剂和有机溶剂的反应体系的酶活定义 100%,测定 rSGT 和 BT 的相对酶活。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pIJ86-*sprT* 的构建

以 ATCC 10137 基因组为模板,利用引物 Psb1、Psb2,PCR 扩增出 *sprT*,产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,可见在 780 bp 附近的扩增条带。纯化后的 PCR 产物和 pMD18-T Simple Vector 连接后,与 pIJ86 质粒同时用 *Sph* I 和 *Bgl* II 双酶切,纯化后连接,得到重组穿梭质粒 pIJ86-*sprT* (图 1)。酶切鉴定表明重组载体构建成功。测序结果与 NCBI 登记序列相一致。本研究选用携带红霉素抗性基因启动子 (PerME) 的

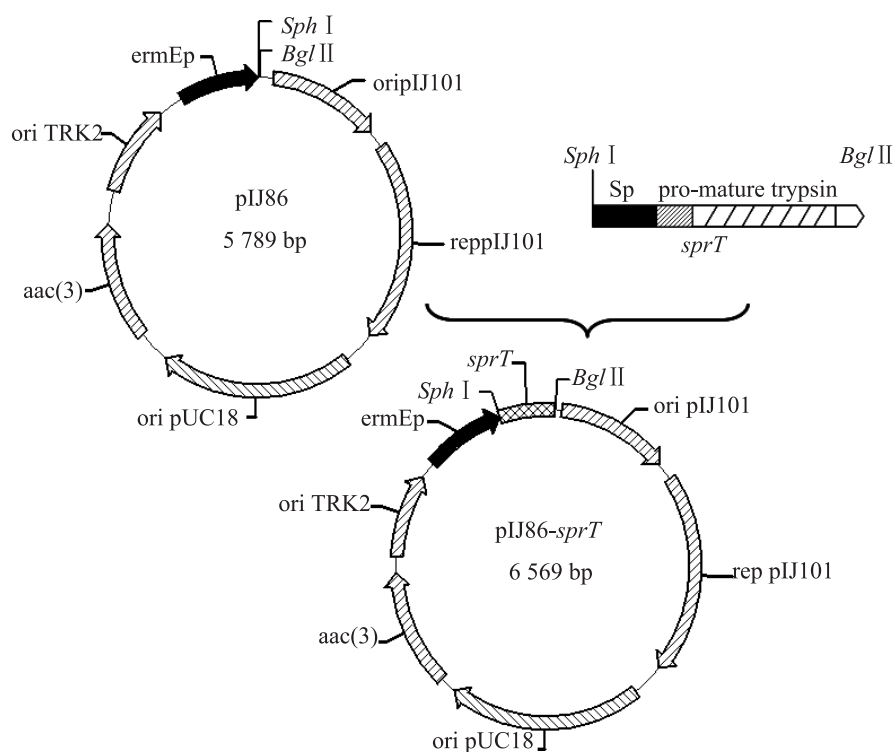


图 1 重组穿梭质粒 pIJ86-*sprT* 的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant shuttle plasmid pIJ86-*sprT*.

pIJ86 质粒为载体, 成功构建了重组表达质粒 pIJ86-*sprT*, 与 *sprT* 自身启动子 (Ptry^[6]) 相比, PermE 具有更高的强度 (图 2)。

2.2 pIJ86-*sprT* 在 TK24 中的表达

分别将质粒 pIJ86 和重组质粒 pIJ86-*sprT* 转化至原生质体 *S. lividans* TK24 挑取阳性转化子, 命名为 TK24/pIJ86 和 TK24/pIJ86-*sprT*。将重组菌株接种至 100 mL 种子培养基 R2YE 中, 200 r/min、30 ℃摇床培养 24 h, 以 5%接种量转接链霉菌发酵培养基 XSH, 从第 3 天开始取样, 之后每隔一天取样, 将 1 mL 样品 5 000 r/min 离心 5 min, 得发酵上清液。根据 BAPNA 法测定酶活, 对照重组菌 TK24/pIJ86 基本检测不到酶活, 携带重组质粒的 TK24/pIJ86-*sprT* 菌株第 3 天可以检测到酶活, 到第 9 天酶活最高可达 3.56 U/mL (图 3)。为进一步确定重组蛋白表达, 利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白条带, 在预测的 28 kDa 处有明显的特异性表达条带, 如图 4 所示。

2.3 发酵培养基的优化

将筛选出的重组菌株 TK24/pIJ86-*sprT* 涂布

PermE

GTGCACGCGGTCGATCTTGACGGGCTGGCGAGAGGT
 GCGGGGGAGGATCTGACCGACGCGGTCCACACGTG
 GCACCGCGATGCTGTTGTGGGCTGGACAATCGTGC
 CGGTTGGTTAGGATCCAGCG

Ptry

GTGGCAGCGGCCACCCGTTCCCGACAATCGCAGCA
TCT**TGAC**GGGTGCATGACCATGCCG**TCGCG**CCCC
₋₃₅₋₁₀
GTCGGGGTCCCACAGCGACCCCCCAC

图 2 PermE 和 Ptry 的序列比较

Fig. 2 Comparison of the sequences of PerME and Ptry. The putative -10 and -35 regions are underlined and in bold.

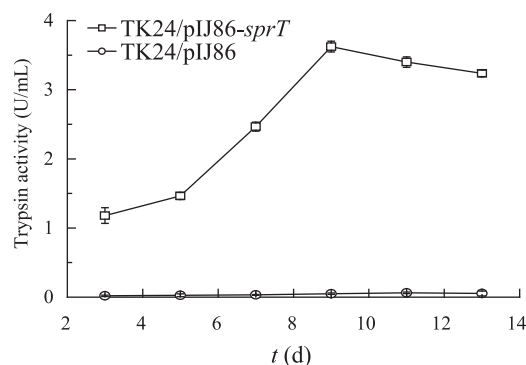


图3 重组 TK24/pIJ86-*sprT* 发酵过程中的胰蛋白酶酶活曲线

Fig. 3 The curve of trypsin activity during fermentation of recombinant TK24/pIJ86-*sprT*.

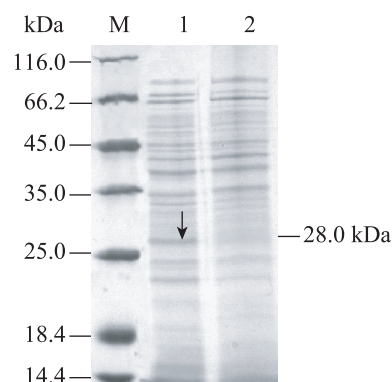


图 4 重组 TK24/pIJ86-*sprT* 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expression proteins in recombinant TK24/pIJ86-*sprT*. M: protein marker; 1: recombinant TK24/pIJ86-*sprT*; 2: recombinant TK24/pIJ86.

于 MS 固体培养基上活化,使其处于良好的生长状态,将活化后重组菌株的孢子接种至种子培养基 R2YE (50 mL/250 mL) 中,200 r/min、30 ℃ 培养 24 h,以 5% 的接种量转接不同的发酵培养基 R2YE、SELF、C5、TSB (50 mL/500 mL),第 3 天开始取样,之后每隔一天取样,测定酶活,结果如图 5 所示。从图中可以看出,R2YE 在第 11

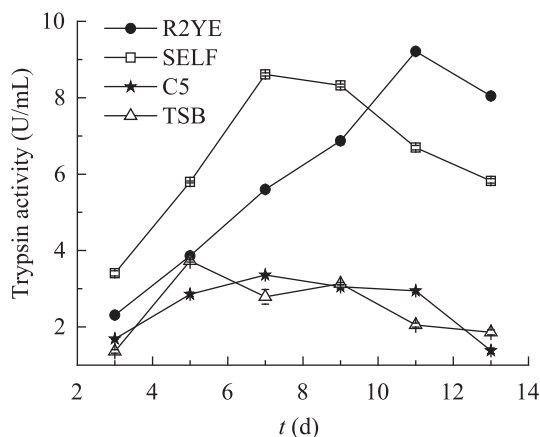


图5 不同发酵培养对重组 TK24/pIJ86-*sprT* 产胰蛋白酶的影响

Fig. 5 Effects of different media on production of trypsin from TK24/pIJ86-*sprT*.

天酶活最高达 9.21 U/mL, SELF 在第 7 天酶活最高达 8.61 U/mL, C5 在第 7 天酶活最高达 3.36 U/mL, TSB 在第 5 天酶活最高达 3.73 U/mL。以上结果表明,以 R2YE 作为发酵培养基可获得最高酶活 9.21 U/mL,但发酵周期较长;以 SELF 为发酵培养基,虽然最高酶活为 8.61 U/mL,但在第 7 天便得到最高值,相比以 R2YE 作为发酵培养基,发酵周期缩短。因此选取 SELF 培养基为重组菌发酵培养基。

2.4 重组胰蛋白酶的分离与纯化

将纯化的重组胰蛋白酶进行 SDS-PAGE 电泳,如图 6 所示,其蛋白条带显示其相对分子质量约为 28 kDa,与报道基本一致,且蛋白带纯度可以用于酶学性质检测。

2.5 rSGT 与 BT 的酶学性质比较

2.5.1 rSGT 和 BT 最适温度及温度稳定性比较

rSGT 和 BT 的最适温度和温度稳定性见图 7。由图 7A 可知,两者的最适温度都在 50 °C 左右,在 10 °C~50 °C 范围内,随着温度的升高, rSGT 和 BT 的活力均成上升趋势,当温度高于 50 °C,

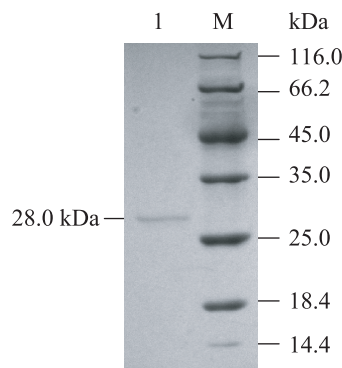


图6 纯化后 rSGT 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the purified rSGT. 1: purified rSGT; 2: protein marker.

两种酶活力迅速降低,70 °C 时催化活性趋近于零;在图 7B 和 7C 中, BT 在 30 °C~40 °C 均能保持较高活力 (>80%),且在 30 °C 几乎没有酶活损失,50 °C 处理 60 min 仍能保持 42.45% 的酶活力; rSGT 在 30 °C 也能保持较高活力,但在 40 °C 时活力明显下降,但在 40 min 内仍能保持 50% 以上的活力,50 °C~70 °C 活力迅速下降,10 min 后基本检测不到酶活。表明虽两者最适温度均在 50 °C 左右,但从稳定性来看,作用温度在 30 °C~40 °C 之间更为合理,且相对于 BT, rSGT 在 40 °C~50 °C 稳定性更差。

2.5.2 rSGT 和 BT 最适 pH 及 pH 稳定性比较

图 8A 中,在不同 pH 反应条件下分析 rSGT 和 BT 活力,发现两者均在中性偏碱性环境下有较高的催化活性,最适反应 pH 为 7.5~10,与 BT 相比, rSGT 具有较高的酸度耐受性,在 pH 5.0 的条件下也能保持 60% 以上的催化活性。但从稳定性上来看(图 8B), rSGT 和 BT 在酸性和中性条件下放置 1 h 后活力几乎没有受到影响,在 pH 8.0 条件下测定酶活力均保持在 90% 以上,而在 pH >9.0 条件下放置, rSGT 和 BT 活力都有不同程度的降低, pH 12.0 条件下, rSGT 活力降低到 40% 以下。

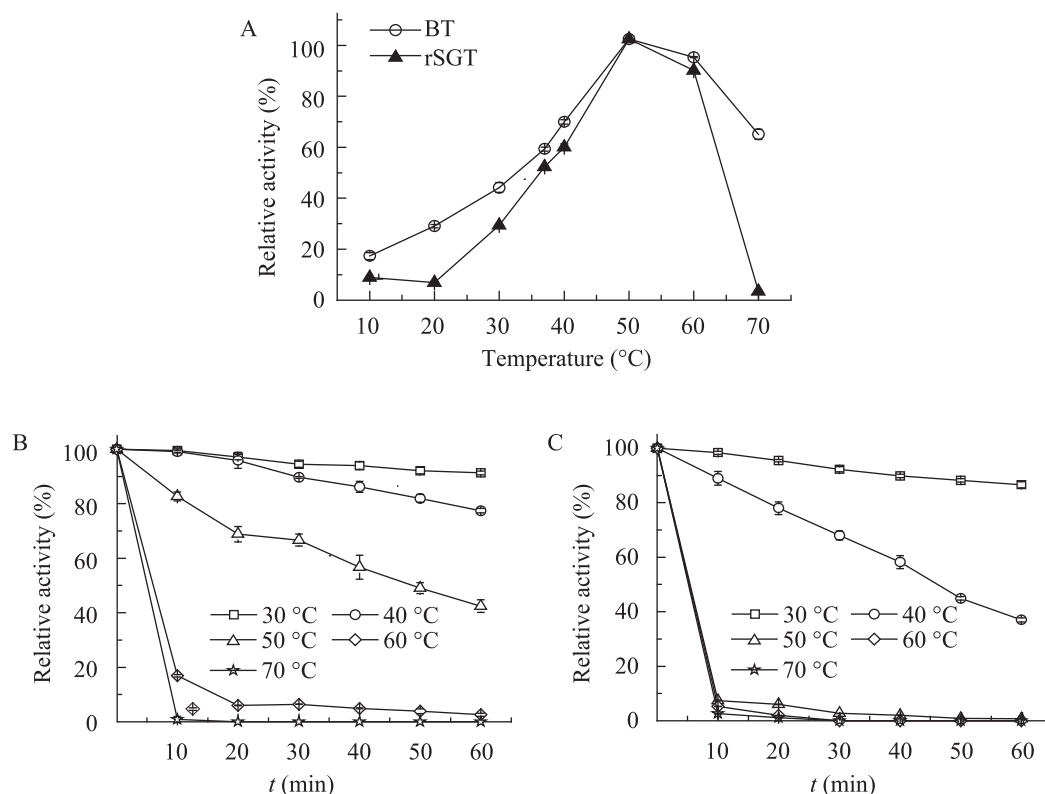


图 7 rSGT 和 BT 的最适反应温度和温度稳定性的比较分析

Fig. 7 Comparative analysis of the optimal reaction temperature and thermostability of rSGT and BT. (A) The optimal reaction temperature of rSGT and BT. (B) The thermostability of BT. (C) The thermostability of rSGT.

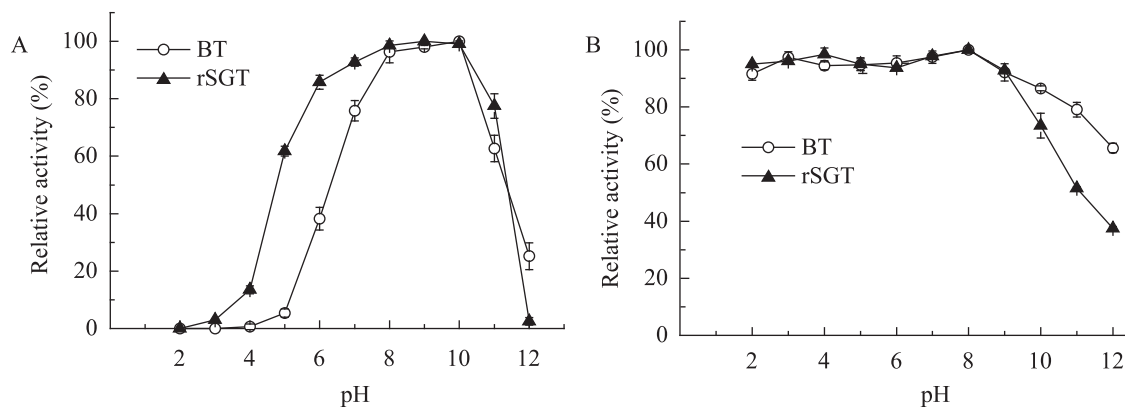


图 8 rSGT 和 BT 的最适反应 pH 和 pH 稳定性的比较分析

Fig. 8 Comparative analysis of the optimal reaction pH and pH stability of rSGT and BT. (A) The optimal reaction pH of rSGT and BT. (B) The pH stability of rSGT and BT.

2.5.3 rSGT 和 BT 酶反应动力学参数比较

分别选用 BAPNA 测定法和 BAEE 测定法, 分析 BT 和 rSGT 在这两种底物反应条件下的 K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m (表 3)。rSGT 与 BAPNA 和 BAEE 两种底物反应的 K_m 相近, 但水解酯键 (BAEE) 的最大反应速率、转换常数 (K_{cat}) 和催化效率 (K_{cat}/K_m) 则分别是水解酰胺键 (BAPNA) 的 8 倍、13 倍和 15 倍; BT 对两种底物的特异性有明显差别, 与 BAPNA 反应的 K_m 是与 BAEE 反应 K_m 的 30 倍, 其对酯键的水解活力远远高于酰胺键, 与报道的大多数鱼类及甲壳

类动物相近^[18]。选用 BAPNA 做底物时, BT 的 K_m 是 rSGT 的 10 倍, 由此可见 rSGT 对酰胺键的特异性远远大于 BT, 其最大反应速率、转化常数和催化效率分别是 BT 的 2 倍、3 倍和 27 倍, 而采用 BAEE 作为底物, BT 的特异性略高于 rSGT, 催化效率相同, 但反应速率和转换常数均小于 rSGT。

2.5.4 金属离子对 rSGT 和 BT 活力的影响比较

各种金属离子对 rSGT 和 BT 活力的影响如表 4 所示, 在两种底物反应条件下, rSGT 和 BT 均能被 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 激活^[19], 被 0.5 mmol/L

表 3 rSGT 和 BT 在两种底物反应条件下的动力学参数的比较

Table 3 Comparison of kinetic properties of rSGT and BT with two kinds of substrates

	BT				rSGT			
	K_m (mol/L)	V_m (mol/(L·min))	k_{cat} (/min)	k_{cat}/K_m (L/(mol·min))	K_m (mol/L)	V_m (mol/(L·min))	k_{cat} (/min)	k_{cat}/K_m (L/(mol·min))
BAPNA	7.86×10^{-4}	4.70×10^{-5}	289	3.67×10^5	8.78×10^{-5}	1.1×10^{-4}	888	1.0×10^7
BAEE	2.39×10^{-5}	3.85×10^{-4}	3778	1.58×10^8	7.23×10^{-5}	8.8×10^{-4}	11316	1.57×10^8

表 4 在两种底物反应条件下各种金属离子对 rSGT 和 BT 活力的影响

Table 4 Effect of different metallic ions on rSGT and BT activity with two kinds of substrates

Metal ions	Concentration (mmol/L)	Relative activity (%)			
		BAPNA		BAEE	
		BT	rSGT	BT	rSGT
H ₂ O	—	100	100	100	100
Ca ²⁺	1.0	113.5±1.6	104.8±2.4	105.5±1.3	105.3±1.7
Mg ²⁺	1.0	99.8±2.3	96.4±4.1	98.3±2.4	100.6±3.2
Zn ²⁺	0.5	88.5±5.2	99.2±1.8	104.1±0.4	107.9±1.5
Cu ²⁺	0.5	85.7±4.3	98.8±4.2	82.8±3.6	91.6±4.3
Pb ²⁺	0.5	78.2±3.2	90.4±3.2	91.7±2.9	93.3±1.8
Co ²⁺	0.5	98.6±1.9	99.2±2.7	93.1±3.9	90.2±5.9
Ag ⁺	0.5	86.9±3.7	73.2±3.0	15.9±4.7	19.6±2.0
Hg ²⁺	0.5	96.0±3.7	94.0±1.3	1.0±0.8	90.8±3.6

的 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 抑制,其中 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Co^{2+} 对 rSGT 和 BT 与两种底物反应的抑制作用均较弱, Ag^+ 对 rSGT 和 BT 与 BAPNA 反应的抑制作用不明显,而对 rSGT 和 BT 与 BAEE 反应的抑制作用较强,在 Hg^{2+} 存在条件下, BT 与 BAEE 反应,酶活力被完全抑制,而 rSGT 与 BAEE 作用只有较弱的抑制作用。 Mg^{2+} 对两种底物的作用效果不明显, Zn^{2+} 对 rSGT 和 BT 与 BAPNA 的反应有一定的抑制作用,但对 rSGT 和 BT 与 BAEE 的反应却有一定的激活作用。由于 rSGT 和 BT 在结构和功能上的相似性,不同金属离子对 rSGT 和 BT 活力的影响也表现出一定的相似性,但在与两种底物的反应中, Ag^+ 、

Hg^{2+} 和 Zn^{2+} 对 rSGT 和 BT 酰胺酶和酯酶的催化活力表现出了一定的差异。

2.5.5 抑制剂和有机溶剂对 rSGT 和 BT 活力的影响比较

抑制剂和有机溶剂对 rSGT 和 BT 活力的影响见表 5,在两种底物反应条件下,CEOM、SBTI 和 Benzamidine 都能强烈抑制 rSGT 和 BT 的活力,与 CEOM、SBTI 和 Benzamidine 能抑制甲壳类动物、鱼和高等脊椎动物的胰蛋白酶活力的报道相符^[18]。PMSF 是一种常见的丝氨酸蛋白酶抑制剂,能够一定程度地抑制 rSGT 和 BT 的活力,对酯键 (BAEE) 的抑制作用明显大于对酰胺键 (BAPNA) 的抑制作用。TPCK 对 rSGT 和 BT

表 5 在两种底物反应条件下各种抑制剂和有机溶剂对 rSGT 和 BT 活力的影响

Table 5 Effect of different inhibitors and organic solvents on rSGT and BT activity with two kinds of substrates

Inhibitor and organic solvents	Concentration	Relative activity (%)			
		BAPNA		BAEE	
		BT	rSGT	BT	rSGT
H ₂ O	—	100	100	100	100
CEOM	10 µg/mL	12.3±5.7	9.2±3.4	7.8±4.3	0.7±4.2
SBTI	10 µg/mL	5.3±3.8	4.3±4.2	5.1±2.7	2.2±1.7
Benzamidine	1 mmol/L	7.0±3.2	8.6±4.8	34.6±5.9	15.7±4.9
PMSF	1 mmol/L	94.7±2.1	92.6±1.9	49.8±3.1	75.5±5.9
TPCK	1 mmol/L	82.4±3.3	74.7±4.5	85.7±4.3	75.2±4.1
Methanol	25%	69.3±1.6	109.9±2.2	101.8±1.8	100.7±3.2
Ethanol	25%	77.2±2.7	101.8±2.7	87.6±1.1	76.3±2.3
Glycerin	25%	62.3±3.5	113.0±3.7	117.1±3.6	96.4±4.1
Acetone	25%	66.7±2.6	103.7±4.9	0.9±0.7	4.4±2.4
DMSO	25%	44.7±3.6	112.3±4.3	125.3±3.9	108.0±3.9

The general serine protease inhibitor, phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), the specific trypsin inhibitors, benzamidine, chicken egg ovomucoid (CEOM), soybean trypsin inhibitor (SBTI) and the specific chymotrypsin inhibitor, Na-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) were selected for the inhibitor assays. Methanol, Ethanol, Glycerin, Acetone and DMSO were selected for the organic solvent assays.

与两种底物的反应均有抑制作用,但抑制作用较弱。在以 BAPNA 为底物时,25%的甲醇、乙醇、甘油、丙酮和 DMSO 对 BT 均有一定的抑制作用,但对 rSGT 却几乎没有抑制,反而使其活力增强,表明当作用于酰胺键时, rSGT 的有机溶剂耐受性要强于 BT,甚至有机溶剂的存在有利于 rSGT 活力的提高。在以 BAEE 为底物时,不同有机溶剂对 rSGT 和 BT 活力的影响不同,甲醇、DMSO 对 rSGT 和 BT 活力有促进作用,乙醇和丙酮对 rSGT 和 BT 有抑制作用,在丙酮存在的条件下,两者的活力被完全抑制。

3 讨论

本研究应用红霉素抗性基因启动子,以 *S. lividans* 为表达宿主,成功实现了胰蛋白酶的高效表达,在此基础上,系统对重组酶酶学性质进行了分析。关于灰色链霉菌胰蛋白酶的异源表达研究,国内外报道相对较少。在 2003 年,Page 等将 *sprT* 基因克隆至质粒 pWB980^[20],并采用来自 *B. subtilis* 的 *sacB* 信号肽,在 *B. subtilis* WB700^[21]中实现了其异源表达^[10]。但是,在 *B. subtilis* 中的相关研究报道仅此一篇。此前,我们根据其叙述方法进行了构建并应用 *B. subtilis* WB700 进行了表达验证。实验结果证实,采用 *B. subtilis* 并不能实现 *sprT* 的异源活性表达(获得大量包涵体,数据未显示)。此外,我们也尝试了在 *E. coli* 中表达,和 *B. subtilis* 中的结果类似,也没有得到活性表达。显然,具有 3 对二硫键灰色链霉菌胰蛋白酶并不适合在 *B. subtilis* 和 *E. coli* 中表达。近日,令桢民等应用真核表达系统,成功实现了灰色链霉菌胰蛋白酶在毕赤酵母

Pichia pastoris 中的活性表达^[16],进一步说明胰蛋白酶中二硫键的形成可能是制约其活性表达的关键。

国内外关于胰蛋白酶的相关研究主要集中在 *S. griseus* 以及同一属的其他菌株,如 *S. lividans*。Kim 等将含有 *sprT* 自身启动子 (Ptry) 和编码基因的全基因片段连接到链霉菌克隆质粒 pWHM3 上,在 *S. lividans* 中实现了胰蛋白酶的表达,最高酶活达到 0.74 U/mL^[11]。而本研究选用 pIJ86 为表达质粒,同样以菌株 *S. lividans* TK24 为宿主,采用 SELF 发酵培养基,最高酶活达 8.61 U/mL,比报道结果提高了 11.6 倍。pIJ86 表达质粒携带红霉素抗性基因启动子 (PerME),该启动子来源于红色糖多孢菌的红霉素合成基因簇,位于 *ermE* 和 *eryC* 之间,是链霉菌组成型表达的强启动子。它有 2 个启动区域 PerME I 和 II,含有 2 对相同方向的-10、-35 区和 2 个转录起始位点(图 2)。而 Kim 等^[6]所采用的 *sprT* 自身启动子 (Ptry) 只含有一个启动区域,其-35 区与 PerME II 的-35 区相同,且 Ptry 的-35 区和-10 区保守序列的间隔也同 PerME II 相似(图 2)。比较发现,与 Ptry 相比,PerME 多出一个启动区域 PerME I,从而使启动子强度增加。此外,在 *S. griseus* 中,胰蛋白酶参与其生理生化的多种调节^[22],*sprT* 基因在转录水平上的表达调控复杂^[23-24],因此,在同属的 *S. lividans* 中采用 *sprT* 基因的自身启动子同样不利于 *sprT* 的表达。由此可见,以菌株 *S. lividans* 为表达宿主,启动子的强度是影响胰蛋白酶表达的重要因素。

此外,为进一步提高产量,本研究比较了 5 种链霉菌常用培养基,结果表明以 R2YE 和 SELF

为发酵培养基时酶活最高,分别为 9.21 U/mL 和 8.61 U/mL。与其他 3 种培养基相比, R2YE 和 SELF 均含有少量游离氨基酸,且 R2YE 中还含有一些微量元素和缓冲盐成分。可见,其高效表达需要多种成分的相互协作,一些微量成分也是影响链霉菌菌丝生长以及高效表达的重要因素。

关于野生链霉菌胰蛋白酶 SGT 酶学性质的报道较多,但对重组酶学性质则缺少系统详尽的报道。Page 等对重组酶和野生酶的底物特异性进行了比较,发现两者降解精氨酸和赖氨酸的最佳比例均为 4:1^[10]。Kim 等研究了温度及 pH 对野生酶和重组酶活力的影响,发现两者并无明显差别^[15]。本文基于纯化的重组链霉菌胰蛋白酶(rSGT),对其酶活性进行了系统的研究,结果表明其酶学性质与 SGT 以及 BT 在最适温度、最适 pH 以及抑制剂的影响等方面表现出极大的相似性^[8,25-26]。但在耐酸性上, rSGT 具有更大的潜力,在 pH 5.0 时还能保持 60% 以上的活力,而其他报道的胰蛋白酶在 pH ≤ 6.0 时,稳定性就急剧下降^[8,15,18,25]。同时,我们还测定了 rSGT 在两种常用底物下 K_m 值,虽与报道的 SGT 相比, rSGT 对两种底物的特异性都有所降低,但其对酰胺键底物的特异性仍远远高于 BT。此外,我们研究了不同金属离子对 rSGT 酰胺酶和酯酶活力的影响,基本与 SGT 的报道相符,但发现 Zn^{2+} 对 rSGT 的酯酶活力有促进作用而对其酰胺酶活力有抑制作用。和其他胰蛋白酶相关报道不同^[25], rSGT 的酰胺酶活力在添加了终浓度为 25% 的有机溶剂后没有受到抑制反而有所提高(表 5)。

综上所述,本研究结果为胰蛋白酶在食品、医药、皮革等诸多工业领域的应用提供了科学依据和选择思路,并为后期链霉菌胰蛋白酶分子水

平上的突变和性质改造(提高耐热性能)明确了方向。

REFERENCES

- [1] Walsh KA. Trypsinogens and trypsins of various species. *Serine Proteases*, 1970, 4: 41–63.
- [2] Wahlby S, Zetterqvist O, Engstrom L. Reaction of two enzyme fractions from *Streptomyces griseus* protease with diisopropylphosphoro-fluoridate. *Acta Chem Scand*, 1965, 19: 1247–1248.
- [3] Trop M, Birk Y. The trypsin-like enzyme from *Streptomyces griseus* (pronase). *Biochem J*, 1968, 109: 475–476.
- [4] Trop M, Birk Y. The specificity of proteinases from *Streptomyces griseus* (pronase). *Biochem J*, 1970, 116: 19–25.
- [5] Olafson RW, Jurasek L, Carpenter MR, et al. Amino acid sequence of *Streptomyces griseus* trypsin. Cyanogen bromide fragments and complete sequence. *Biochemistry*, 1975, 14: 1168–1177.
- [6] Kim JC, Cha SH, Jeong ST, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of *Streptomyces griseus* trypsin gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 181: 707–713.
- [7] Stroud RM, Kossiakoff AA, Chambers JL. Mechanisms of zymogen activation. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1977, 6: 177–193.
- [8] Olafsoni RW, Smillie LB. Enzymic and physicochemical properties of *Streptomyces griseus* trypsin. *Biochemistry*, 1975, 14: 1167–1172.
- [9] Read RJ, James MN. Refined crystal structure of *Streptomyces griseus* trypsin at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 1988, 200: 523–551.
- [10] Page MJ, Wong SL, Hewitt J, et al. Engineering the primary substrate specificity of *Streptomyces griseus* trypsin. *Biochemistry*, 2003, 42: 9060–9066.
- [11] Kim, Jong H, Soon KH. Overproduction of bacterial trypsin in *Streptomyces*-Optimization for *Streptomyces griseus* trypsin production by recombinant *Streptomyces*. *Kor J Microbiol Biotechnol*, 2008, 36: 28–33.

- [12] Zhu GP, Zhang Y, Xu Y, et al. Overexpression and detection of the mutated glucose isomerase GIG138P and GIG138P-G247D in *Streptomyces lividans*. Chin J Biotech, 2002, 18(3): 304–307 (in Chinese).
朱国萍, 张颖, 徐昉, 等. 葡萄糖异构酶突变体 GIG138P 和 GIG138P-G247 在变铅青链霉菌中的高效表达及检测. 生物工程学报, 2002, 18(3): 304–307.
- [13] Lee WS, Park CH, Byun SM. *Streptomyces griseus* trypsin is stabilized against autolysis by the cooperation of a salt bridge and cation- π interaction. J Biochem, 2004, 135: 93–99.
- [14] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, et al. Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. Norwich: John Innes Foundation Press, 2000.
- [15] Koo BJ, Kim JM, Byun SM, et al. Articles-optimal production conditions of *Streptomyces griseus* trypsin (SGT) in *Streptomyces lividans*. J Biochem Mol Biol, 1999, 32: 86–91.
- [16] Ling ZM, Ma TB, Li JH, et al. Functional expression of trypsin from *Streptomyces griseus* by *Pichia pastoris*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2012, 39: 1651–1662.
- [17] Chi WJ, Song JH, Oh EA, et al. Medium optimization and application of an affinity column chromatography for *Streptomyces griseus* trypsin production from the recombinant *Streptomyces griseus*. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19: 1191–1196.
- [18] Wu ZQ, Jiang GL, Xiang P, et al. Anionic trypsin from North Pacific krill (*Euphausia pacifica*): purification and characterization. Int J Peptide Res Ther, 2008, 14: 113–120.
- [19] Caldwell RA. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. J Agric Food Chem, 1992, 40: 43–46.
- [20] Wu SC, Wong SL. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. J Biotechnol, 1999, 72: 185–195.
- [21] Wu SC, Yeung JC, Duan YJ, et al. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 3261–3269.
- [22] Horinouchi S. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Front Biosci, 2002, 7: 2045–2057.
- [23] Kato JY, Chi WJ, Ohnishi Y, et al. Transcriptional control by A-factor of two trypsin genes in *Streptomyces griseus*. J Bacteriol, 2005, 187: 286–295.
- [24] Eun AO, Kim MS, Chi WJ, et al. Characterization of the *sgtR1* and *sgtR2* genes and their role in regulating expression of the *sprT* gene encoding *Streptomyces griseus* trypsin. FEMS Microbiol Lett, 2007, 276: 75–82.
- [25] Outzen H, Berglund GI, Smalld AO, et al. Temperature and pH sensitivity of trypsins from Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with bovine and porcine trypsin. Comp Biochem Physiol, 1996, 115: 33–45.
- [26] Sekizaki H, Itoh K, Murakami M, et al. Anionic trypsin from chum salmon: activity with p-amidinophenyl ester and comparison with bovine and *Streptomyces griseus* trypsins. Compar Biochem Physiol Part B, 2000, 127: 337–346.

(本文责编 郝丽芳)