

2, 5-DKG 还原酶 I 的分离纯化与性质研究*

李 越*** 陈策实** 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要: 欧文氏菌 ER97 高效表达了从棒状杆菌 SCB3058 克隆的 2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸 (2, 5-DKG) 还原酶 I 基因, 5 L 罐发酵后, 收集菌体破碎, 将胞内可溶性的蛋白通过硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换柱层析和 Phenyl Sepharose CL-4B 疏水柱层析后分离纯化到了 2, 5-DKG 还原酶 I, 纯化了 5 倍, 得率 27 %, 比活力为 3, 418 U/mg。测定了该酶的一些特性参数: 分子量为 34 kD, 等电点为 6.0, 它以 NADPH 为辅酶, 将 2, 5-DKG 还原为 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG), 对 NADPH 和 2, 5-DKG 底物的 K_m 值分别是 0.29 mmol/L 和 14.7 mmol/L, 1 mmol/L Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等有强烈抑制作用, EDTA 和巯基乙醇对该酶没有抑制作用, 酶的最适 pH 为 7.0, 最适反应温度为 40 °C。

关键词: 欧文氏菌 ER97, 2, 5-DKG 还原酶 I, 纯化与性质

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0063-05

Studies on Purification and Characterization of 2, 5-DKG Reductase I from ER97*

LI Yue*** CHEN Ce-Shi** YIN Guang-Lin

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract: 2, 5-DKG reductase I was purified from cell-free extracts of a recombinant, ER97 by a procedure involving ammonium sulfate precipitation and successive column chromatography on DEAE-Sepharose CL-6B and Phenyl Sepharose CL-4B with 5 fold purification, 27 % recovery and 3, 418 U/mg specific activity. The molecular weight of the enzyme estimated by SDS-PAGE was 34kD. The isoelectric point was estimated to be 6.0 by PAG-IEF. The optimum pH was 7.0 and the optimum temperature was about 40°C. The enzyme can catalyze the stereospecific NADPH-dependent reduction of 2, 5-DKG to 2-KLG. The Michaelis-menten constant (K_m) for 2, 5-DKG and NADPH were 0.29 mmol/L and 14.7 mmol/L respectively. The enzyme is specific for NADPH and 2, 5-DKG, 1 mmol/L Cu^{2+} or Zn^{2+} could highly inhibited the enzyme activity. EDTA and β -Mercaptoethanol have no effect on the enzyme activity.

Key words: *Erwinia* ER 97, 2, 5-DKG reductase I, Purification and properties

2, 5-DKG 还原酶能以 NADPH 为辅酶还原 2, 5-DKG 产生 2-KLG, 其中 2-KLG 是生产维生素 C 的重要前体, 一般采用莱氏法或两步发酵法^[1]获得, 由于反应步骤繁多, 促进了构建基因工程菌实现葡萄糖一步发酵产生 2-KLG 的研究。Miller 等 1987 年首先从 *Corynebacterium* sp. ATCC31090 纯化得到一个 2, 5-DKG 还原酶^[2], 随后 Sonoyama 等人也从 *Corynebacterium* sp. SHS752001 (ATCC31090 突变株) 纯化得到两个 2, 5-DKG 还原酶, 它们在分子量, 催化能力方面都有所不同^[3]。

在本实验室研究成功的从葡萄糖串联发酵产生 2-KLG 工艺的基础上^[4,5], 我们从棒

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770021)

** 为共同第一作者

*** 通讯作者 Tel: 021-63852734, E-mail: liyue@sibs.ac.cn

收稿日期: 2005-02-04, 修回日期: 2005-04-04

状杆菌 (*Corynebacterium* sp.) SCB3058 中克隆得到两个 2,5-DKG 还原酶的基因^[6,7], 其中 2,5-DKG 还原酶 I 基因在大肠杆菌中 P1 启动子和 CI 温敏调控蛋白的控制下表达的酶比活力很高。衍生质粒 pBLS 导入能够利用葡萄糖高产 2,5-DKG 的欧文氏菌 SCB125 中, 构建成功工程菌 ER97, 通过提高温度诱导, 2,5-DKG 还原酶 I 获得了高效表达^[8]; 将工程菌 ER97 培养后, 我们对 2,5-DKG 还原酶进行了分离纯化和进一步的性质研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

欧文氏菌 SCB125 和棒状杆菌 SCB3058 由本实验室保存, ER97 ($\text{Amp}^r \text{Str}^r$) 为带重组质粒 pBLS 的欧文氏菌 SCB125 由本实验室构建。

1.2 培养基

斜面培养基 LB, 常规配方。种子培养基 (100 mL): 葡萄糖 2 g, 蛋白胨 1 g, 酵母粉 0.5 g, NaCl 1 g, pH 7.0, 8 磅灭菌 30 min, 加 Str 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。发酵培养基除不加 Str 外, 所有成分与种子培养基相同。

1.3 试剂

DEAE-Sepharose CL-6B 和 Phenyl Sepharose CL-4B 树脂为 Pharmacia 公司产品, 等电点标准蛋白为 Bio-Rad 公司产品, 低分子量标准蛋白为上海丽珠东风生物技术公司产品。NADPH 购自 Boehringer 公司, 2-酮基-D-葡萄糖酸 (2-KDG), 5-酮基-D-葡萄糖酸 (5-KDG) 为 Sigma 产品, 2-KLG 和 2,5-DKG 由本实验室合成。

1.4 方法

1.4.1 ER97 产 2,5-DKG 还原酶 I 的培养条件: 取一环菌苔接入种子培养基内, 在 500 mL 三角瓶装量 80 mL, 28℃, 220 r/min (往复式) 培养 10 h, 以 5% 接种到装 3.5 L 发酵培养基的 5 L B. Braun 自控发酵罐中, 28℃, 200 r/min, pH 7.0 培养 8 h 后, 升温至 42℃ 继续诱导培养约 2 h, 收集菌体。

1.4.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析: SDS-PAGE 参考分子克隆实验指南进行, 分离胶浓度 15%。等电聚焦电泳参考 Bio-Rad Mini-IEF 说明书。用考马斯亮蓝 R250 染色, 扫描分析结果。

1.4.3 2,5-DKG 还原酶活性测定: 在 30℃, 100 μL 酶液加到 2.7 mL 0.1 mol/L Tris-Cl (pH 7.0) 中, 再加 100 μL 浓度为 3~5 mmol/L 的 NADPH 溶液及 100 μL 过量底物 2,5-DKG, 测定 A_{340} 的变化, 酶活力以第 1 min 内 A_{340} 下降值来计算。根据标准曲线换算成 NADPH 浓度变化, 计算酶活力。酶活力单位 (U) 定义为: 每分钟氧化 1 μmol NADPH 所需的酶量。

1.4.4 蛋白质的定量: 采用 Bradford 法。

1.4.5 酶促反应产物分析: 100 mmol/L Bis-Tris-Cl pH 7.0, 3.3 mmol/L 2,5-DKG, 1.4 mmol/L NADPH 体系加入纯酶液 100 μL (含酶活约 342 U) 后总体积 0.5 mL, 30℃ 保温 12 h。纸层析用新华 1[#] 滤纸, 展层剂: 丁酮: 丙酮: 甲酸: 水 = 80: 6: 2: 12 (v/v), AHF 显色剂: 苯胺 0.93 g、邻苯二甲酸 1.66 g 溶于 100 mL 水饱和的正丁醇。HPLC^[9] 因为检测器灵敏度关系底物浓度分别提高到 40 mmol/L 2,5-DKG, 25 mmol/L NADPH

体系加入酶液 100 μ L, 30 $^{\circ}$ C 保温 12 h。检测用 Bio-Rad Aminex A-27 树脂填充柱 (4.6 mm \times 250 mm), 45 $^{\circ}$ C, 流动相为 0.1 mol/L 甲酸铵 (pH 3.2), 流速 1.0 mL/min, RI 检测器。

1.4.6 酶的分离与纯化: 参照 Sonoyama^[3] 的方法作了修改, Buffer A: 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.0), Buffer B: 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.0)。所有步骤均在 4 $^{\circ}$ C 层析冷柜内进行。

无细胞抽提液的制备: 发酵液 4,600 r/min, 离心 30 min 得湿菌体 8.84 g。用 Buffer A 洗涤并悬浮于 45 mL 体积。细胞悬浮液在冰浴中用超声波破碎 20 min, 间隔为 0.5 min。15,000 r/min, 离心 30 min, 去除细胞碎片和未破碎菌体。获取上清液作为无细胞抽提液。

硫酸铵分级沉淀 (冰浴中进行): 取固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 于研钵研碎成粉末。按 0 $^{\circ}$ C 时 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶解度称取一定量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 加入无细胞抽提液, 使饱和度达到 30%。静置 30 ~ 60 min 后 15,000 r/min, 离心 30 min, 获取上清液, 再加入一定量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使饱和度达到 60%。静置 30 ~ 60 min 后 15,000 r/min, 离心 30 min。收集沉淀溶解于 Buffer A 中, 将其置于透析袋中对 2 L Buffer B 透析过夜, 换 2 L 新鲜的 Buffer B 继续透析完全。

DEAE Sepharose CL-6B 柱层析: 透析后的溶液用 DEAE Sepharose CL-6B 柱 (20 cm \times 3 cm i. d.) 层析, 先用 Buffer B 洗脱至平衡, 再用 Buffer B 与含 0.4 mol/L NaCl 的 Buffer B 阶段梯度洗脱, 在线检测 A_{280} , 收集不同时间段的组分后测定酶活。

Phenyl Sepharose CL-4B 柱层析: 活性部分中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 饱和度达到 30%。溶液置于 Phenyl Sepharose CL-4B 柱 (15 cm \times 0.6 cm i. d.), 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度为 30% 的 Buffer B 洗脱至平衡。再用含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度为 30% 的 Buffer B 和 Buffer B 组成梯度溶液洗脱。

2 结果与讨论

2.1 酶的纯化

菌株 ER97 的无细胞抽提液通过硫酸铵分级沉淀、离子交换、疏水层析等步骤对 2,5-DKG 还原酶 I 蛋白进行了纯化, 柱层析图谱见图 1 和图 2。

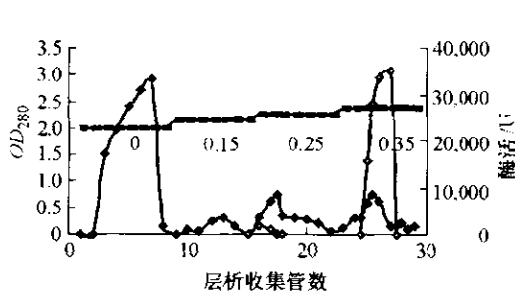


图 1 DEAE-Sephacrose CL-6B 层析图谱

— \bullet — OD_{280} , — \blacktriangle — 氯化钠, — \diamond — 酶活

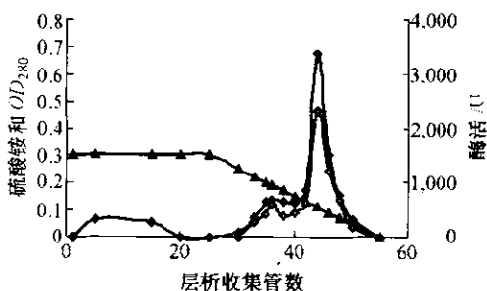


图 2 Phenyl-Sephacrose CL-4B 层析图谱

— \bullet — OD_{280} , — \blacktriangle — 硫酸铵, — \diamond — 酶活

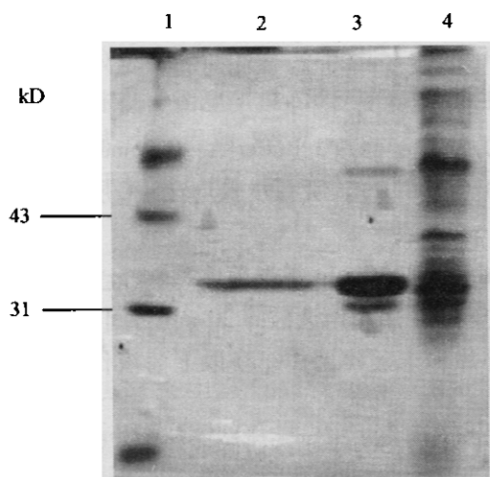


图3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

1 蛋白分子量 Marker, 2 Phenyl-Sepharose CL-4B 层析后有活性组分, 3 DEAE-Sepharose CL-6B 层析后有活性组分, 4 透析液

DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换一步除去大部分杂蛋白, 在含 0.35 mol/L NaCl 的 Buffer B 洗脱时, 有一个主要酶活峰出现, 此外在含 0.15 ~ 0.25 mol/L NaCl 的 Buffer B 洗脱时, 有一个微弱酶活峰出现, 推测为欧文氏菌中背景还原酶—2-酮基醛糖还原酶。经三步分离后比活力 720 U/mg 提高到为 3, 418 U/mg, 纯化了约 5 倍, 回收率为 27 %。通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 仅呈现一条带 (图 3)。

2.2 酶的基本性质

2.2.1 分子量: 由于 2,5-DKG 还原酶 1 是一个单体蛋白, SDS-PAGE 结果经扫描分析, 根据低分子量标准蛋白, 测得该酶分子量为 34,000 kD, 与理论值相符。(图 3)

2.2.2 等电点: 用聚丙烯酰胺等电聚焦电泳, 根据等电点标准蛋白测得该酶的等电点为 6.0。

2.2.3 最适 pH: 其它反应条件不变, 改变反应体系的 pH, 测定在 pH 5.5 ~ 9.0 缓冲液中酶的活力, 发现该酶的最适反应 pH 为 7.0 (图 4)。

2.2.4 最适温度: 在最适 pH 缓冲液中, 分别测定该酶在 20℃ ~ 55℃ 不同温度下还原 2,5-DKG 的相对活力, 该酶的最适反应温度为 40℃ (图 5), 在 30℃ ~ 45℃ 稳定性较好, 55℃ 已经测不到活力, 而在 4℃ 保存两个月后酶活无明显下降。

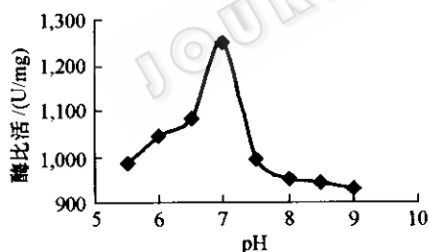


图4 2, 5-DKG reductase 1 的最适 PH

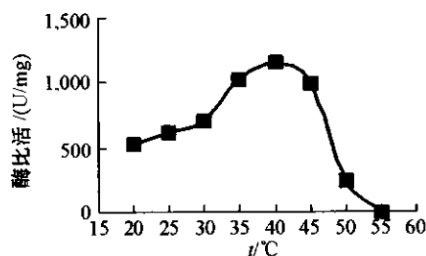


图5 2, 5-DKG reductase 1 的最适温度

2.2.5 米氏常数 K_m 值: 以 V 对 $V/[S]$ 做图, 以 NADPH 为辅酶, 将 2,5-DKG 还原为 2-KLG, 2,5-DKG 浓度为 3.3 mmol/L 时测得它对 NADPH 的 K_m 值是 0.29 mmol/L, NADPH 浓度为 3.3 mmol/L 时测得它对 2,5-DKG 底物的 K_m 值是 14.7 mmol/L (图略)。

2.2.6 酶促反应产物分析: 实验组 A_{340} 明显下降, 不加酶的对照基本不变, 与标准的 R_f 值比较, 实验组在 2-KLG 位置出现一个对照没有的粉红色斑痕, 但 2,5-DKG 位置的棕色斑痕依然存在, 颜色略浅 (图略), 说明纯化的 2,5-DKG 还原酶 1 的确催化了 2,5-DKG 还原, 产生了产物 2-KLG, 但反应进行的不完全。HPLC 分析显示实验组在 2-KLG 标准品的延滞时间位置出现峰, 而没有在 2-KDG 标准品的延滞时间位置出现峰, 对照

组没有峰,因此进一步说明酶促反应产物是 2-KLG,不是 2-KDG。催化反应具有立体专一性。

2.2.7 底物特异性:以催化还原 2,5-DKG 为标准,测定该酶对 5-酮基果糖、2-KLG、2-KDG、5-KDG 底物的相对还原活力,结果表明:该酶对 2,5-DKG 有最强的还原能力,对 5-酮基果糖、2-KLG 有较低的还原活力,对 2-KDG、5-KDG 还原能力极低。

2.2.8 几种化合物对 2,5-DKG 还原酶 I 的影响:实验发现 1 mmol/L Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 离子对该酶有强烈的抑制作用,只保留有正常约 20 % 的活力。 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、EDTA 和巯基乙醇对该酶基本没有影响。

2.3 讨论

本文的工作目的是为了根据 2,5-DKG 还原酶 I 的性质对以后的发酵工艺和表达优化提供借鉴和指导,并为进一步获得 2,5-DKG 还原酶 I 多克隆抗体,在以后的工作提供有效检测手段打下基础。在进行酶促反应产物分析时,2,5-DKG 没有全部转化成 2-KLG,其原因应该在于这是一个动力学平衡过程。如果在体外反应体系中及时将生成的 2-KLG 移去,2,5-DKG 应该可以转化的较为完全;若不能及时除去 2-KLG,则反应体系中会存在 2,5-DKG。

在进行酶促反应产物分析时,2-KLG、2-KDG、2,5-DKG 和 5-KDG 等葡萄糖衍生物分析十分困难,它们之间的结构差异很小,导致它们的性质非常接近。已经报道有少数几种离子交换柱 HPLC 可以用于分析这类衍生物,如 Bio-Rad 公司的 Aminex A27 ~ A29、HPX-87,Shodex 公司的 KC-811 等,其中 Aminex A27 ~ A29 的分析条件有比较详细的报道^[9],在我们的工作中采用了 Aminex A27。HPLC 分析系统对这类衍生物的分析虽然存在分辨率和灵敏度不够高,耗时较长的缺点。但是总的说来还是目前最好的手段之一。如果条件许可,采用毛细管区带电泳(CZE)也是一种很好的方法,其分辨率较高。

致谢 李 氏在等电聚焦电泳方面提供帮助,陈 芳、乔春红和华东理工大学实习生董浩迪同学在工作中也提供了一些帮助,特此致谢。

参考文献

- [1] 尹光琳,陶增鑫,于龙华,等.微生物学报,1980,20:246~251.
- [2] Miller J V, Estell D A, Lazarus R A. J Biol Chem, 1987, 262: 9016~9020.
- [3] Sonoyama T, Kobayashi K. Ferment Technol, 1987, 65: 311~317.
- [4] 何建明,萨维琪,王毅武,等.工业微生物,1994,24:10~15.
- [5] 萨维琪,何建明,王毅武,等.工业微生物,1994,24:7~11.
- [6] 李 越,陈策实,尹光琳.微生物学通报,1999,26:260~265.
- [7] 陈策实,尹光琳.微生物学报,1998,38:435~440.
- [8] 陈策实,尹光琳.生物工程学报,1999,15:196~201.
- [9] Lazarus R A, Seymour J L. Anal Bioe, 1986, 157: 360~366.