

# 大肠杆菌 $\beta$ -D-半乳糖苷酶的纯化与鉴定

曾贞元 刘明 刘桂珍 汪紫兰 朱嘉庸

(卫生部上海生物制品研究所)

**摘要** 大肠杆菌  $\beta$ -D-半乳糖苷酶两种纯化方法: DEAE A50 和 sepharose 6B 两次层析法、与底物类似物的亲和层析法均可获高纯度酶,后者方法简便,适于大量制备。酶在 PAGE 上显示六条区带;主区带与其余三条活性带迁移率分别为 13.5, 7.5, 6.3 和 4.6mm。酶主区带分子量 130000。酶与其相应抗体的免疫电泳呈两条沉淀线。酶米氏常数为  $4.348 \times 10^{-4}M$ 。其 SH 基含量 18.5 个/克分子蛋白。酶悬液于 4℃ 保存稳定性较好。活力 500u/mg 蛋白。可达美国 Sigma VI 型规格。该酶可用于抗原、抗体。如某些激素药物半抗原物质的酶免疫分析。

**关键词** 大肠杆菌;  $\beta$ -D-半乳糖苷酶;提纯

半乳糖苷酶用于酶免疫分析具有无内源性干扰、底物无致癌性,且显色稳定的优点<sup>[1-3]</sup>。与荧光底物相结合可作超微量荧光酶联分析<sup>[4]</sup>。对微量激素、药物的定量分析<sup>[5,6]</sup>,以及病毒、单克隆抗体等测定具有灵敏的特点<sup>[7,8]</sup>。本文报道大肠杆菌  $\beta$ -D-半乳糖苷酶的纯化与鉴定结果。

## 材料与方 法

### (一) 菌株与培养

大肠杆菌  $K_{12}$  野生型,乳糖发酵株接种于 0.4% 乳糖-乳糖琼脂斜面。37℃ 培养 20 小时,经二次转接,移种于上述培养基克氏瓶,培育 20 小时。用适量 pH7.5 0.01 M Tris-HCl 缓冲液洗下菌苔,离心洗涤二次,收集菌体。

### (二) 半乳糖苷酶的纯化

1. DEAE A50 和 sepharose 6B 两次层析法: 用含 0.01M 二巯基乙醇 pH 7.5 的 0.01M Tris-HCl 缓冲液将上述菌体配成 10% (W/V) 悬液,经超声波破碎菌体,加入饱和度为 20% 硫酸铵,4℃ 过夜、离心。上清液中补加硫酸铵饱和度至 40%。离心后将沉淀溶解于上述缓冲液,透析。所获酶粗制品上 DEAE A50 层析柱(5 × 33cm),用起始缓冲液与 4% NaCl 组成线性梯度进行洗脱。于 280nm 测吸光度 A,以及用邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷 (ONPG) 为底物测酶活性。合并酶活性峰部分,经 sepharose 6B (25 × 85cm) 凝胶过滤。用饱和度为 40% 硫酸铵浓缩活性峰,即为半乳糖苷酶纯化品。

2. 底物类似物亲和层析法: 培养菌液按上述方法超声破碎菌体、硫酸铵沉淀,透析而获酶粗制品。用 pH7.5 0.05M Tris-HCl 缓冲液平衡对氨基苯-硫代-半乳糖吡喃苷-琼脂糖 4B 亲和层析柱(2.5 × 13cm),以 1ml/min 流速上样,并用平衡缓冲液平衡过夜,用 pH 10 的 0.1M 硼酸钠洗脱,饱和度 50% 硫酸铵浓缩活性峰、离心收集。即为纯化的半乳糖苷酶。

### (三) 蛋白含量的测定

用双缩脲法,以牛血清白蛋白作参考标准。

### (四) 酶米氏常数的测定

将底物 ONPG 用 pH 7.3 PBS 配成 0.25, 0.5, 0.66, 1.0, 2.0, 4.0 及 10mM 浓度。1mg/ml 酶样品用 PBS 缓冲液作适当稀释。分别取上述浓度底物液 0.4ml 与合适稀释度酶液 0.4 ml 混合。37℃ 精确反应 25 分钟,加 1MNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1ml 中止反应。420nm 测吸光度 A<sub>0</sub>。以各底物浓度相对吸光度的双倒数作图求 K<sub>m</sub> 值。

### (五) 酶活力测定

参照美国 Sigma 公司产品说明书进行。比色杯依次加入 0.1M pH 7.3 PBS 2.6ml, 3.36 M 二巯基乙醇 0.1ml, 0.03 M MgCl<sub>2</sub> 0.1ml, 和合适稀释度酶液 0.1ml, 37℃ 保温 3 分钟,然后加入 0.068M ONPG 0.1ml, 混匀。于 410nm 记录 A 值而计算酶单位。

$$\text{酶单位 (u/mg)} = \frac{A_{410\text{nm}}/\text{分钟} \times 3}{3.5 \times \text{反应物中酶 mg 数}}$$

### (六) SDS-PAGE 测定酶分子量

按 Laemmli 的 SDS-PAGE 不连续垂直板系统测定<sup>[9]</sup>。样品在含 1%SDS-二巯基乙醇-溴酚蓝混合液内,100℃ 加热 2 分钟。点样 30  $\mu$ g。染色后用 Shimadzu CS-910 型扫描仪记录区带迁移率。以一系列已知蛋白分子量对数相对 R<sub>f</sub> 值作图计算分子量。

### (七) 杂酶成分检测

葡萄糖氧化酶检测用我所临床诊断试剂室提供的 GOD-POD 法进行。碱性磷酸酶用对硝基苯酚-磷酸盐显色判断。蔗糖酶用酵母蔗糖酶作阳性对照,以测定水解蔗糖后生成葡萄糖含量检定。用邻硝基苯- $\alpha$ -D-半乳糖苷检查异构酶的存在。

### (八) 酶 SH 含量测定

按 Grassett 介绍的方法<sup>[10]</sup>,按 SH (M 浓度) =  $\frac{A_{324\text{nm}}}{1.98 \times 10^4} \times \frac{520}{500}$  公式计算含量。

## 结 果

### (一) $\beta$ -D-半乳糖苷酶的纯化

酶粗制品经 DEAE A50 层析表明: 经梯度洗脱出五个蛋白峰(图 1)。第一峰不含酶

活性，第二峰含低滴度酶活性。加至 2% NaCl 梯度后出现其余三个酶活性峰。其中第三峰活力最高。合并 3、4、5 峰，经 Sepharose 6B 层析仍可分出二个蛋白峰，分别位于  $V_0$  和  $V_1$  体积部位(图 2)。第二峰集中大部分酶活性，并

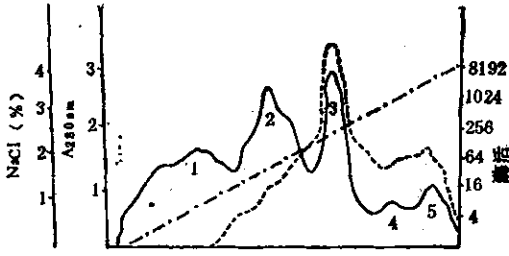


图 1 半乳糖苷酶在 DEAE<sub>A50</sub> 柱层析图  
——光吸收，-----酶活性，-----NaCl 浓度

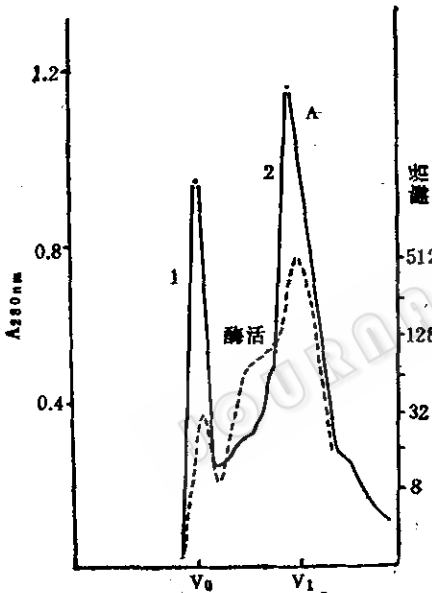


图 2 半乳糖苷酶在 sepharose 6B 柱层析图  
1,2 示蛋白峰

且活力明显高于 1 峰。收集第二峰即为二次层析纯化的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶。

图 3 是用底物类似物亲和层析纯化的酶洗脱图谱。当酶粗制品直接通过该柱，即呈现二个蛋白峰。第 1 峰几乎不含酶活性。用平衡缓冲液充分洗涤该柱后，再用 pH10 的 0.1M 硼酸钠洗脱，即得含酶活性的蛋白峰。实验表明亲和层析法简便，经一步层析即可得高活性酶，回收率较 DEAE-Sepharose 二层析高，每 100

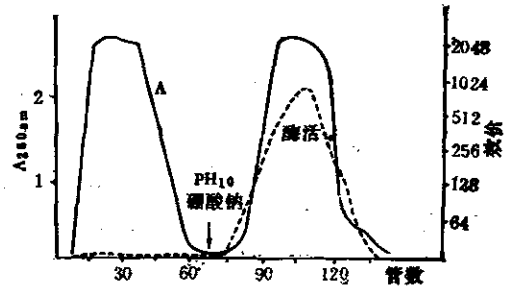


图 3 半乳糖苷酶的亲和层析图

ml 培养物获 1mg 纯化酶，约较后者多一倍。另外柱可反复使用。适于大量制备。

## (二) 酶纯化品的分析鉴定

1. 电泳：以上二种方法制备的纯化酶分别进行 PAGE 电泳分析。结果表明两者均呈现六条区带，而美 Sigma VIII 型和西德 Boehringer 公司产品为五条蛋白区带，但它们的图形基本相近。区带酶活性分析见靠阴极端四条区带均对 ONPG 底物显色。区带扫描，酶主区带和其余三条活性带的迁移率分别为 13.5, 7.5, 6.3 和 4.6mm (图 4)。至于电泳移动快、靠阳极端的一条区带对邻硝基苯- $\alpha$ -D-半乳糖苷显色，而另一条较为不清晰的区带，对以上两种底物均不显色，这与 Steers 报道结果相近<sup>[11]</sup>，可能含半乳糖苷酶的二聚体。上述结果表明大肠杆菌  $\beta$ -D-半乳糖苷酶可能存在多分子型。

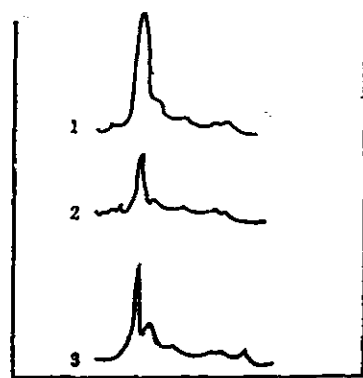


图 4 半乳糖苷酶的 SDS-PAGE 电泳扫描图

1. 西德 Boehringer 酶产品 2. 美国 Sigma VIII 型酶 3. 自制 DEAE<sub>A50</sub>-sepharose 6B 二次层析酶

2. 分子量：SDS-PAGE 测定  $\beta$ -D-半乳糖苷酶分子量结果表明，酶主区带分子量的测定值为 130,000，与文献报道  $\beta$ -D-半乳糖苷酶单

聚体分子量为 135000 数值相近<sup>[12]</sup>。

3. SH 基含量: 按所述方法测定了酶制品中游离 SH 基含量, 每一分子酶含 17.3—18.5 个 SH 基, 与国外产品指标相近 (表 1)。

表 1  $\beta$ -D-半乳糖苷酶游离 SH 基含量

酶制品	SH (mol)/酶(mol)
DEAE A 50-sepharose 6B 层析酶	17.3
亲和层析酶	18.5
西德 Bohringer 酶	17.5

4. 免疫特异性: 两种工艺酶制品和国外两家公司同类产品与我们制备的抗酶血清进行免疫电泳分析。结果显示四种样品均对抗酶血清产生两条沉淀线。加 ONPG 和 4mU (四甲基伞形基- $\beta$ -D-半乳糖苷)保温, 沉淀线显色或呈绿色荧光, 进一步证明四种样品具有相同抗原性 (图 5)。

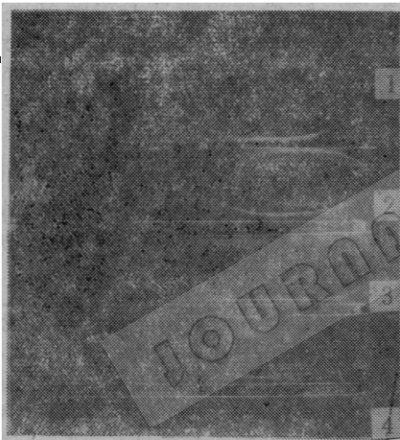


图 5 半乳糖苷酶免疫电泳图

1. 亲和层析酶; 2. DEAE A 50-sepharose 6B 二次层析酶; 3. Sigma VIII 酶; 4. Bohringer 酶

为进一步检查纯度, 用四批酶制品检查其杂酶成分, 未见含蔗糖酶、葡萄糖氧化酶和碱性磷酸酶, 仅见对邻硝基苯- $\alpha$ -D-半乳糖苷显色。看来含微量异构酶。

### (三) 半乳糖苷酶的某些特性

1. 米氏常数: 以 ONPG 为底物分别测定了所制备的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶和美国 Sigma VIII 型酶反应动力学常数 ( $K_m$ ), 两者分别为  $4.384 \times 10^{-4} M$  ( $-\frac{1}{K_m} = -2.3$ ) 和  $3.846 \times$

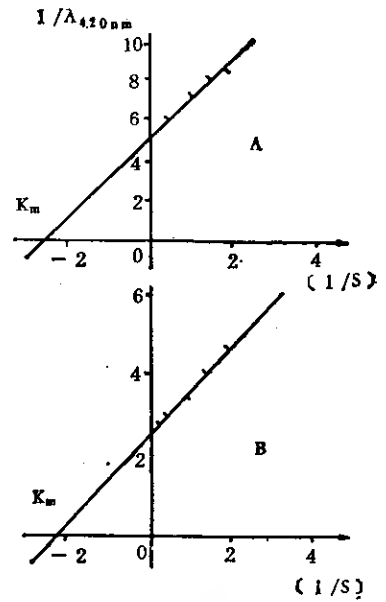


图 6 半乳糖苷酶米氏常数 ( $K_m$ ) 测定图  
A. Sigma VIII 型 B. 自制样品

$10^{-4} M$  ( $-\frac{1}{K_m} = -2.6$ ) (图 6)。酶对底物 (ONPG) 的亲合力表明, 两者酶反应动力学大致相似。

2. 酶活力的测定: 试制了几批次半乳糖苷酶, 酶活力水平在 500u/mg 蛋白左右。可达美国 Sigma VI 型水平 (表 2)。

表 2  $\beta$ -D-半乳糖苷酶活力测定结果

批号	测定值(u/mg 蛋白)
8301	460
8305	524
8401-1	476
8401-2	384
8402	509
8501	571
8502	656
Sigma VI	480*
Sigma VIII	616

\* 厂商标明值为 500

3. 酶稳定性: 将酶悬于饱和度为 40% 硫酸铵中, 于 4 $^{\circ}C$  保存, 三批酶测定中, 两批放置近二个月活力下降 10%, 而另一批酶保存 4 个月仍无明显改变。初步表明  $\beta$ -D-半乳糖苷酶悬液保存于 4 $^{\circ}C$  稳定性较好 (图 7)。

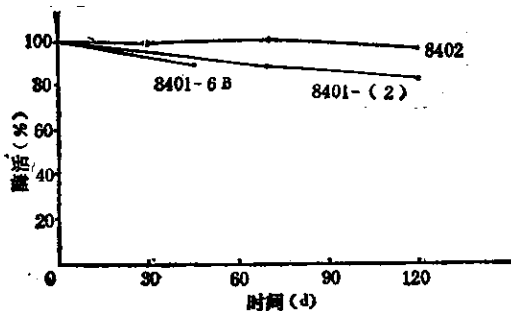


图7 半乳糖苷酶 4°C 保存活力变化

综上所述可见,介绍的两种方法均可制备高纯度的大肠杆菌  $\beta$ -D-半乳糖苷酶。目前我们已研究了  $\beta$ -D-半乳糖苷酶在 EIA 分析中的应用,酶经戊二醛一步法标记抗人 IgG,建立了 ELISA 测定程序,已用于人 IgG,人群破伤风抗体、单克隆抗体检测、获得满意结果<sup>[13]</sup>。同时用于孕酮、皮质醇半抗原标记,初步建立了该酶的液相竞争测定程序。因此大肠杆菌  $\beta$ -D-半乳糖苷酶的研制、将为酶免疫测定方法提供应用价值。

## 讨 论

关于  $\beta$ -D-半乳糖苷酶的分离与纯化,我们参照文献介绍的方法加以修改<sup>[12]</sup>。两种方法制备的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶基本相同,除含活性的四聚体外(分子量 540000),尚可能存在其他聚集体,或含极少量的异构酶。

半乳糖苷酶的稳定性较好,能耐受某些化

学修饰<sup>[1,2]</sup>。叠氮钠防腐不影响活性,酶在 pH 5—10 范围活力稳定,并且其抗体或半抗原结合物也较稳定<sup>[1]</sup>。ELISA 保温反应后,ONPG 本底无色;另外底物配制后 4°C 保存几周仍不变色,这些均对实际操作有利。

近年来又报导了合成该酶的大分子底物<sup>[14]</sup>,因此  $\beta$ -D-半乳糖苷酶不但可作超微量荧光酶联分析,而且还可作酶放大免疫测定 (EMIt)<sup>[15]</sup> 和底物标记荧光 (SLFIA) 分析应用<sup>[6]</sup>。显然, $\beta$ -D-半乳糖苷酶的研制为某些酶免疫分析方法的建立与应用提供了良好的基础。

## 参 考 文 献

- [1] Dray, F. et al.: *B. B. A.*, 403: 131, 1975.
- [2] Dittmar, D.: *Clin. Chem.*, 25(2): 227, 1979.
- [3] Borzini, D. et al.: *J. Immunol Method*, 44: 323, 1981.
- [4] Hosli, P. and S. S. Arramea: *Clin. Chem.*, 24(8): 1325, 1978.
- [5] Susumu, I.: *J. Biochem.*, 86(4): 943, 1979.
- [6] Wong, R. C. et al.: *Clin. Chem.*, 25(5): 686, 1979.
- [7] Cobbold, S. P. et al.: *J. Immunol Method*, 44: 125, 1981.
- [8] Harmon, M. W. et al.: *J. Clin. Microb.*, 17: 305, 1983.
- [9] Laemmli, V.: *Nature*, 227: 680, 1970.
- [10] Grasset, D. R. and J. F. Murray: *J. A. B. B.*, 119: 41, 1960.
- [11] Steers, E.: *J. B. C.*, 246: 196, 1971.
- [12] Sally, L. et al.: *B. B. A.*, 181: 20, 1969.
- [13] 曾贞元: 待发表。
- [14] Gibbons, I. et al.: *Anal. Biochem.*, 102: 167, 1980.
- [15] Gibbons, I. et al.: *Clin. Chem.*, 27(9): 1602, 1981.