

大肠杆菌 α -D-半乳糖苷酶的提纯及特性*

苏悌之 亓 珊 运文慧 郭长旺 徐 铃

(北京市营养源研究所)

摘要 大肠杆菌中与抗原 K₈₈ ab 基因相连锁的棉子糖操纵子 (raf) 编码的 α -D-半乳糖苷酶经硫酸铵沉淀, Sepharose 4B 和 DEAE 纤维素等提纯步骤获纯化品, 其在 PAGE 上呈单一电泳区带, 分子量 80000。粗酶品经 Sepharose 4B 后呈现为两个酶活性峰。该酶特性与染色体编码的同功酶有明显差异。最适温度为 35—37℃, 最适 pH 7.5。以 PNPG、蜜二糖、棉子糖为底物, 其米氏常数分别为 0.11, 2.1 和 136 mmol/L。Mn²⁺ 离子影响酶稳定性, 然而可以被巯基试剂消除。双扩散免疫实验初步表明, 产 H₂S 基因连锁的 raf 操纵子编码的 α -D-半乳糖苷酶与该酶可能具有相同抗原性。

关键词 大肠杆菌; α -D-半乳糖苷酶; 提纯

α -D-半乳糖苷酶在甜菜工业上用于去除干扰蔗糖回收的棉子糖, 在豆类食品加工中则用于降解引起人肠道不适的寡糖类^[1]。大肠杆菌 α -D-半乳糖苷酶至少包括由其染色体蜜二糖操纵子 (mel) 和质粒棉子糖操纵子 (raf)

编码的两大类型(依次简称类型 I 和 II)^[2]。类型 II 酶具有不同血清型^[3]。本文以编码类型 II 酶的再克隆基因为材料, 对该酶的提纯及特性

* 胡良彪、罗薇曾协助部分工作, 特此致谢。

进行了研究。

材料与方法

(一) 菌种

质粒 pFM100 及 pRU613 分别为野生型质粒 pRI8801 和 p1021 的 *raf* 再克隆质粒^[4,5], 由 Mooi 和 Schmitt 馈赠。两种杂合质粒编码的 α -半乳糖苷酶均系组成型酶。菌株 C600 (*thr*, *leu*, *thi*, *SupE* 44, *lac*, *ton* A21) 的 pFM100 转化子为 R₄₀₀。菌株 M₁₉₀₀ (*mel* B₃, *lacY96*, *mel*-B) 的 pRU613 转化子为 BN107。

(二) 培养

采用含 600 μ g/ml 氨苄青霉素的 LBT 培养基。其每升含胰水解蛋白 10 g, 水溶酵母 5 g, 氯化钠 5 g, 胸腺嘧啶 0.025 g。菌体在 37℃ 下培养 10—12 小时, 至产酶高峰期收获。

(三) 酶活测定

基本按 Schmitt 方法测定^[2], 但改用 pH7.5 含 38 mmol/L 疏基乙醇的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (PB)。酶动力学测定及部分酶特性分析, 则直接在日立 330 分光光度计保温杯内进行, 于 420 nm 波长记录吸光度。反应液组成: 2.3 ml PB, 15 μ l 20mmol/L 对硝基苯- α -D-半乳糖苷 (PNPG), 15 μ l 酶液。以每分钟催化 1 μ mol/L 对硝基苯生成的酶量定为 1 个酶活力单位。

以蜜二糖作为底物时, 采用 Barton 法^[5]; 以棉子糖作底物时则按 Somogyi 法^[6]。以催化生成 1 μ g 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位。

(四) 蛋白质测定

按 Folin-酚法^[7]。

(五) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

按 Laemmli 法^[8]。以考马斯亮蓝 R250 染色。

(六) 酶抗血清制备

参照 Cooper^[9] 的方法, 免疫注射纯酶 5 次, 每周一次。

(七) 酶纯化

全部纯化过程在 4℃ 冷室内进行, 提纯步

骤如下:

1. 粗酶液制备: 发酵液于 4℃ 冷却后离心悬入 1/10 体积 25 mmol/L PB (pH 7.5)。超声波破碎后离心, 收集上清液为粗酶液。

2. 硫酸铵沉淀: 粗酶液加硫酸铵至饱和度 50%, 冰浴搅拌 1 小时后离心。

3. Sepharose 4B 层析: 将上述离心沉淀物悬入适量 PB, 上样层析。采用 1.1 \times 29 cm 层析柱。流速 4 ml/h。将酶活性流分合并后, 以 50% 饱和度硫酸铵沉淀。离心收集沉淀物, 并重新悬入 PB, 透析过夜。

4. DEAE 纤维素层析: 含酶透析液上柱, 用 2 倍柱体积平衡缓冲液洗脱。之后以分别含 0.1 mol/L 和 0.3 mol/L 氯化钠的 PB 线性梯度洗脱。层析柱 1 \times 17 cm, 流速 8 ml/h。

结 果

(一) 酶的纯化

α -D-半乳糖苷酶的各步纯化结果见表 1。

表 1 α -D-半乳糖苷酶的提纯

	总酶活性 ($\times 10^3$)	总蛋白 (mg)	比活 (u/mg)	提纯倍 数	回收率 (%)
粗酶液	497	185	2687	—	—
50%(NH ₄) ₂ SO ₄	364	46.7	7775	3	73
Sepharose 4B	207	17.8	111635	4.3	42
DEAE-纤维素	158	4.6	34108	13.0	32

Sepharose 4B 层析后, 获两个酶活性峰 (图 1-A 中的“1”及“2”)。第 1 峰位于排阻极限洗脱液组分, 活性甚低。第 2 峰 $K_{av} = 0.86$, 为酶活性主峰。但第 2 峰酶液再次经 Sepharose 4B, 未见第一峰出现。从分子量判断, 1 峰似乎为高聚合状态的酶。DEAE 纤维素层析表明, 该酶在 0.2 mol/L 氯化钠时被洗脱。合并后的酶液, 在圆盘凝胶电泳上为单一区带。根据电泳迁移率判断, 该酶分子量为 80000, 与文献报道相近^[2] (见图 2)。

用上述纯化酶液制备的抗血清, 与两种不同来源 *raf* 操纵子编码的酶进行免疫扩散, 表明二者可能具有相同抗原 (图 3)。

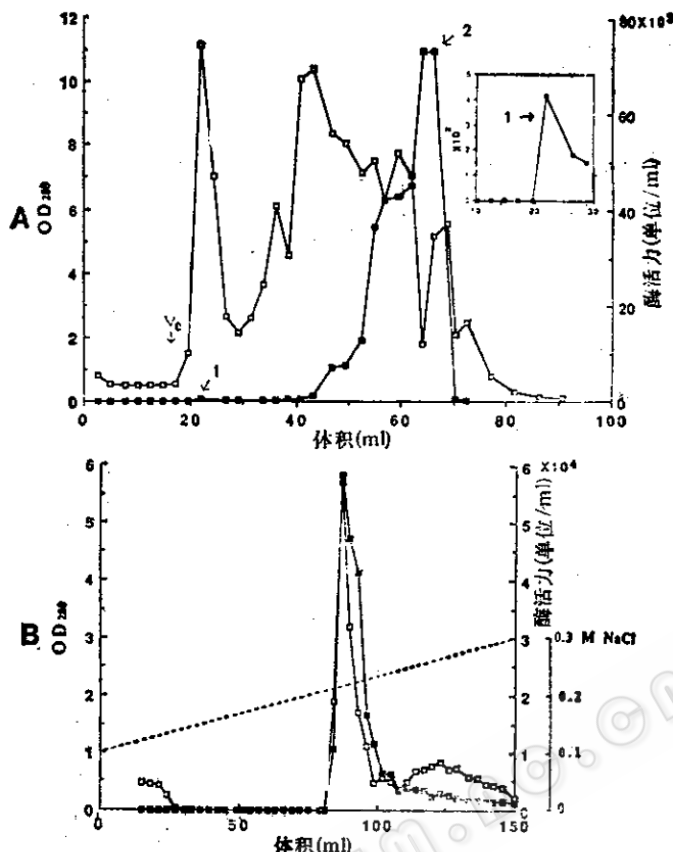


图1 Sepharose 4B 及 DEAE 纤维素柱层析

A. Sepharose 4B 凝胶过滤。“1”及“2”为酶峰。第1酶峰放大图见右上方图。V₀表示用氯化钠开始线性梯度洗脱。B. DEAE 纤维素柱层析 —■—: 酶活力曲线; —□—: OD₂₈₀ 吸收曲线; -----: 0.1 mol/L 至 0.3 mol/L 氯化钠线性梯度洗脱曲线。

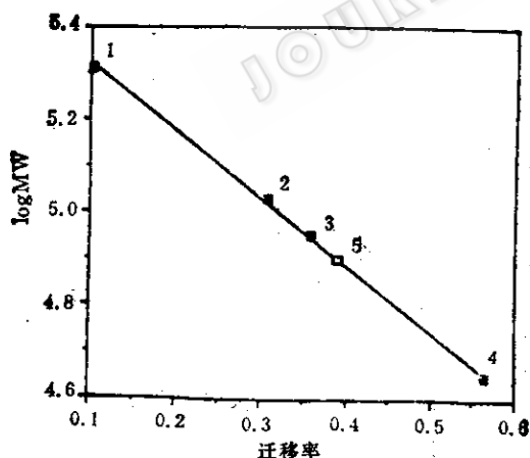


图2 SDS 圆盘电泳测定酶分子量

1. 兔肌球蛋白 (205000);
2. β-半乳糖苷酶 (116000);
3. 磷酸化酶 b (97400);
4. 卵白蛋白 (45000);
5. α-D-半乳糖苷酶 (80000)

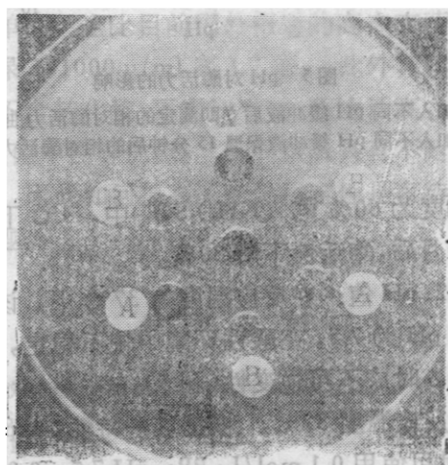


图3 α-D-半乳糖苷酶的双扩散免疫图谱

“A”: R₄₀ 来源 α-D-半乳糖苷酶; “B”: BN107 来源 α-D-半乳糖苷酶; 中央孔: 兔抗 R₄₀ 来源 α-D-半乳糖苷酶血清

(二) 影响酶活性的因素

1. 温度: 纯化的 α-D-半乳糖苷酶的最适

温度范围为 35—37℃。当高于 37℃, 酶的半衰期急骤下降(见图 4)。纯化酶在 PB 中或含

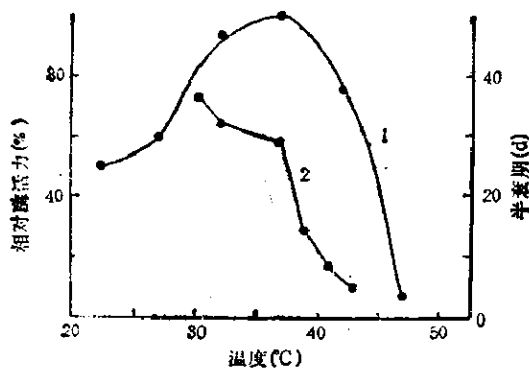


图4 温度对酶活力的影响

1. 保温 15 分钟后的相对酶活力; 2. 不同温度下保温后的酶活半衰期

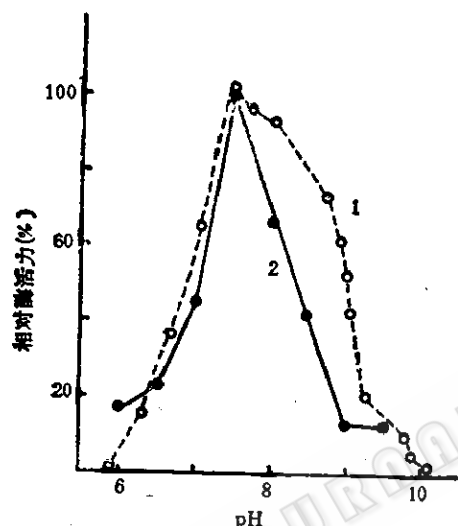


图5 pH 对酶活力的影响

1. 加入不同 pH 缓冲液后立即测定的相对酶活力曲线。
2. 加入不同 pH 缓冲液保温 15 分钟后的相对酶活力曲线。

饱和度为 60% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中, 4°C 下保存 3 个月后, 酶活性下降 30%。

2. pH 值: 在反应温度为 37°C 下, 该酶的最适 pH 为 7.5, 在酸性环境中较不稳定, 当 pH 低于 6 时成不可逆变性(图 5)。

反应温度 37°C 。根据这一特性, 在 pH 6—8.5 时可使用 0.1 mol/L PB; pH 7.5—9.0 时使用 0.04 mol/L 巴比妥缓冲液; pH 8.5—9.7 时则使用 0.1 mol/L 甘氨酸缓冲液。

3. 巯基对酶活力的保护作用: α -D-半乳糖苷酶(II 型)与 I 型酶不同^[10], 加入巯基乙醇的增进酶活效果较小(图 6)。当巯基乙醇浓度

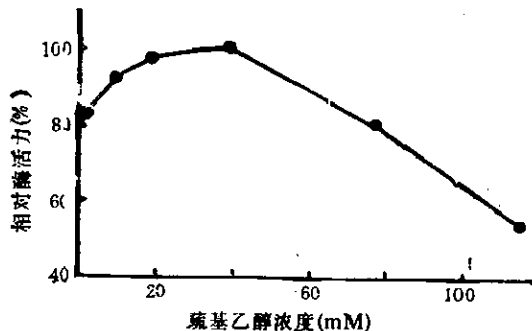


图6 巯基试剂对酶活力影响

为 10—40 mmol/L 时酶活性较高, 当浓度超过 40 mmol/L 后, 酶活明显下降, 说明该酶处于高还原状态对其活力不利。

4. 金属离子: 浓度为 4.27 mM 的各种供试离子中, Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} 和 Zn^{2+} 对 α -D-半乳糖苷酶的酶活力有抑制作用, 而 Ca^{2+} , Li^+ , K^+ , NH_4^+ 和 Mg^{2+} 则未见影响(图 7-A)。 Mn^{2+} 在保温后立即测定时酶活力与对照基本相同, 这与 Schmitt 报道一致^[2]。但我们发现随保温时间延长, Mn^{2+} (5mmol/L) 对酶活力有不利影响。这一抑制作用可被 5mmol/L 二硫代苏糖醇 (DTT) 解除(图 7-B)。因此该酶与需 Mn^{2+} 的 I 型酶明显不同^[10]。

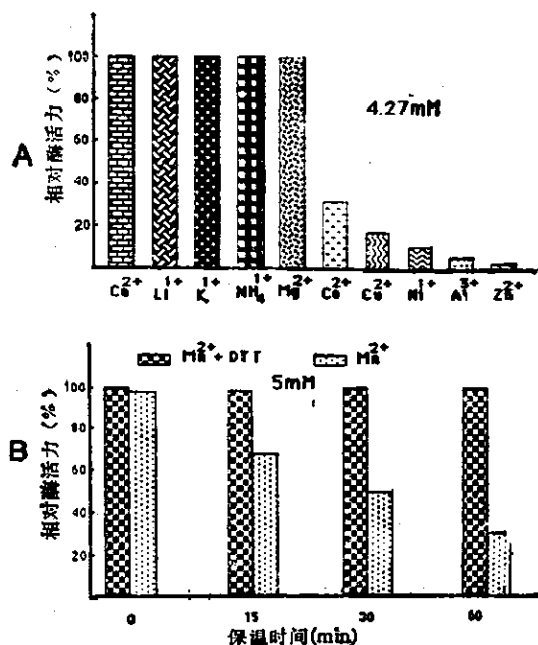


图7 各种金属离子对酶活力的影响

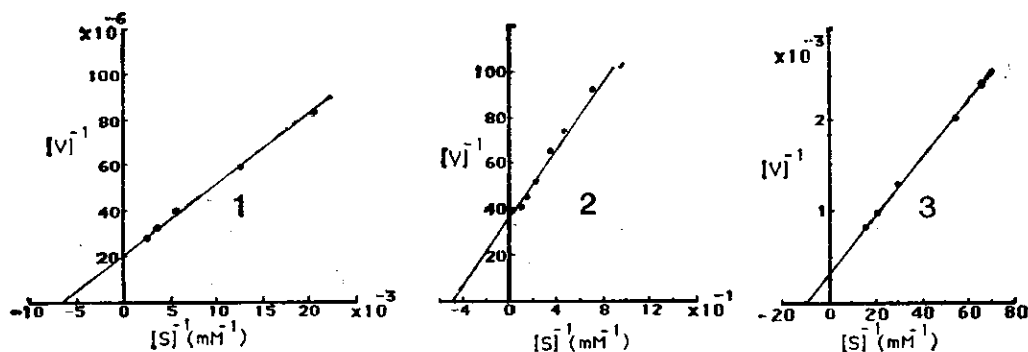


图8 不同底物的 Lineweaver-Burk

1. 棉子糖 2. 蜜二糖 3. PNPG

5. 寡糖类: 供试各种糖 (0.1 mol/L) 对 PNPG 为底物的酶活力测定均表现有不同程度抑制。其中蜜二糖抑制作用最强, 当其浓度 37 mmol/L 时酶活力测定值即下降 59% (见表 2)。

表 2 一些寡糖对 PNPG 酶解反应的影响

糖类 (0.1 mol/L)	抑制百分率(%)
D-甘露糖	68.7
D-半乳糖	55.0
D-果糖	59.4
D-山梨糖	53.1
D-鼠李糖	48.4
D-葡萄糖	27.0
D-木糖	37.5
D-核糖	34.4
乳糖	53.1
麦芽糖	53.1
蜜二糖	95.1
棉子糖	27.0

6. 缓冲液: 该酶在 PB 中较稳定。在巴比妥缓冲液中虽瞬时 (<1 分钟) 酶活力高于 PB, 但随时间延长, 酶活力迅速下降。在以磷酸、醋酸或盐酸配制的 Tris 缓冲液中, 酶活力略有不同, 但均明显低于 PB 酶液。因此, Tris 碱基是抑制酶活力的关键因素, 这与 Kawamura 的结果不一致^[11]。

7. 米氏常数: 以 PNPG、蜜二糖和棉子糖为底物, 其米氏常数分别为 0.11、2.1 和 136 mmol/L (图 8)。因此在自然环境下蜜二糖可能为该酶的主要作用底物。

讨 论

大肠杆菌中质粒携带的 raf 操纵子常与产 H₂S 的基因连锁 (如质粒 p1021), 或与引起幼畜腹泻的 K₈₈ 抗原基因连锁 (如质粒 pRI 8801)。Schmitt 已纯化了前一类型质粒编码的 α-半乳糖苷酶^[12]。现对后一类型质粒编码的半乳糖苷酶分析表明, 两者酶学特征基本相似, 为同源基因产物。

经再克隆后的 α-半乳糖苷酶基因明显产量增加。我们用 LBT 培养基培养 BN107, 摇瓶条件下, 每毫升产量可达 490000 Barton 法酶活力单位。这比目前国外报道的高产真菌的最高纪录 181000 u/ml 高 1.7 倍。此外, 该工程菌有不含转化酶, 不需诱导物, 酶比活高, 最适 pH 值偏中性等优点。然而该酶具有不耐热的特性。因此如何提高酶的热稳定性是有待研究的问题。

参 考 文 献

- [1] 刘波等: «酶制剂工业», 科学出版社, 780—794, 1984。
- [2] Schmid K. & Schmitt R.: *Eur. J. Biochem.* 67: 95—104, 1976.
- [3] Schmid K. et al.: *Gen. Micro.* 114: 477—481, 1979.
- [4] Mooi F. R. et al.: *Nucleic Acid Res.* 6: 849—866, 1979.
- [5] Barton R. R. et al.: *Anal. Biochem.* 14: 258—260, 1966.
- [6] Somogyi M.: *J. Biol. Chem.* 195: 19—23, 1952.
- [7] 潘家秀等: «蛋白质化学研究技术» 科学出版社, 北京, p. 28, 1979.

- [8] Laemmli U. K.: *Nature*. 227: 680—685, 1970.
- [9] Cooper T. G.:《生物化学工具》,人民卫生出版社,1980.
- [10] Schmitt R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22(5): 473—479, 1966.
- [11] Kawamura S. et al.: *Agr. Biol. Chem.* 40(4): 641—648, 1976.