

糖化酶一个主要组分的纯化和有关光谱的测定

张海龙 关国华 孙世魁 李壮 黄程芳

(吉林大学分子生物学系, 长春 130023)

摘要 采用糖化酶粗酶制剂, 经抽提、硫酸分级和 DEAE-纤维素层析等程序纯化了糖化酶一个主要组分, 并经电泳鉴定被纯化至均一状态, 分子量为 89 000。于不同条件下, 测定了该组分的圆二色性谱和荧光发射谱, 取得了关于该组分构象的一些重要结果。

关键词 糖化酶, 纯化, 圆二色性谱, 荧光发射谱

糖化酶(EC3.2.1.3)是最重要的工业酶制剂之一, 广泛用于制糖、制酒和发酵等工业部门^[1,2]。长期以来, 一些研究者比较注重其生产和应用技术方面的研究, 而对其分离纯化、结构构象和有关性质的研究较少^[3]。本文主要对糖化酶 89 000 组分的分离纯化和不同条件下的有关光谱学进行了研究, 报告于下。

1 材料与方法

1.1 材料

糖化酶原料为市售工业级商品, 无锡酶制剂厂生产。

1.2 试剂和仪器

DEAE-纤维素 52 为 10hatman 产品; 其它试剂均为国产 AR 级(上海试剂厂或北京化工厂产); 可见分光光度计为 723 型; 低温层析分析装置为 LKB 产品。

1.3 方法

酶活力测定: 参考文献[4]的方法。

蛋白浓度测定: 采用 Lowry 等人的方法^[5]。

酶纯度鉴定: 采用 Davis 等人的方法^[6]。

酶的分子量测定: 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[7]。

荧光发射谱测定: 采用日立-850 型荧光光度计, 激发波长为 281.2nm, 蛋白浓度为 0.25mg/ml, 光程为 0.5cm(石英杯), 扫描范围为 190~300nm。

圆二色性谱测定: 采用 JASCO-500 型圆二色性仪, 蛋白浓度为 0.25mg/ml, 光程为 0.5cm(石英杯), 扫描范围 190~300nm。

2 结果与讨论

2.1 酶的分离纯化

2.1.1 抽提: 粗酶干粉(g): 蒸馏水(ml)为 1:10, 室温下缓慢搅拌抽提 2h, 于 700×g 下离心 10min, 上清液为粗酶液, 平均比活力为 206u/mg。

2.1.2 硫酸分级: 取粗酶液一定量, 搅拌下缓慢加入研细的硫酸铵粉末, 充分搅拌溶解, 使饱和度达到 80%, 置低温处过夜。次日, 于 700×g 下离心 10min, 沉淀溶于 40ml pH7.6 和 0.05mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中, 并对该缓冲液透析除去铵离子。于 14000×g 下离心 10min, 得上清液, 比活力为 304u/mg。

2.1.3 DEAE-纤维素 52 层析: 将来自硫酸分级的酶液上 DEAE-纤维素 52 柱, 并以前述缓冲液进行流洗。确认杂蛋白全部流洗干净后, 于 LKB 层析装置中, 以 pH7.6~3.0 和 0.05mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液进行自动 pH 梯度洗脱, 并自动收集不同蛋白峰。从图 1 可见, 共出现三个洗脱峰, 即峰 I、II 和 III。经分析证实, 峰 I 和 II 为杂蛋白峰, 只有峰 III 为糖化酶的活力峰, 比活力可达到 565u/mg。

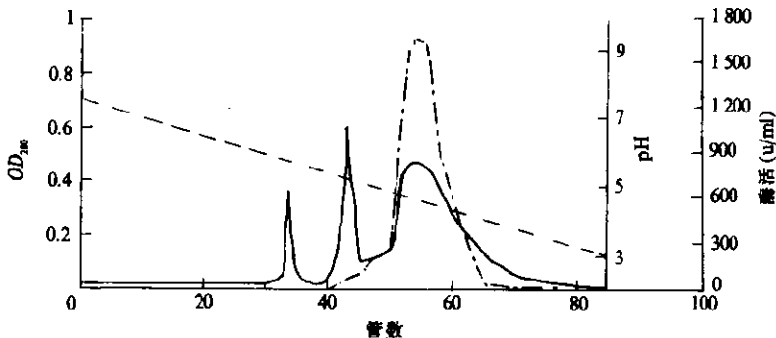


图 1 DEAE-纤维素柱层析

柱规格: $\phi 2.5 \times 25\text{cm}$, 流速: $15 \sim 20\text{ml/h}$

—蛋白质, - - - - - pH, ······糖化酶活力 (u/ml)

酶的分步收率如表 1 所列。在上述纯化过程中, 酶的比活达到 565u/mg , 收率为 5.1%, 酶被纯化 2.7 倍。

2.2 酶主要组分的纯度鉴定和分子量测定

2.2.1 纯度鉴定: 采用盘状电泳, 对 DEAE-纤维素层析后的酶活力峰进行了鉴定。将脱色后的电泳胶条通过日本岛津 CS-910 薄层扫描仪进行线性扫描, 吸收波长为 600nm , 结果如图 2 所示。盘状电泳显示出一条带, 薄层扫描图只出现一个单一陡峰, 酶被纯化至均一状态。

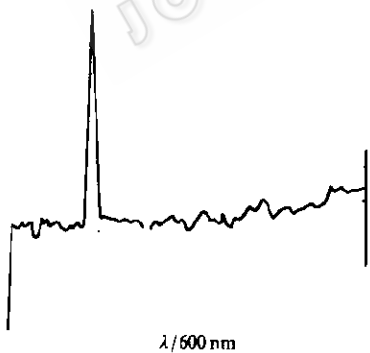


图 2 糖化酶 89000 组份的聚丙烯酰胺凝胶电泳薄层扫描图

2.2.2 分子量测定: 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳, 对糖化酶的均一组份的分子量进行了测定。得分子量为 89 000。

2.3 酶主要组分有关光谱测定

2.3.1 圆二色性谱的测定

① 碘乙酸存在下的圆二色性谱: 于不同浓度碘乙酸的存在下, 对糖化酶 89 000 组份的圆二色性谱分别进行了测定, 结果如图 3 所示: 天然酶于 208 和 218nm 处存在典型的双负峰, 其为 α -螺旋构象的特征峰。采用 $[\theta]_{208}$ 单值法计算, 得出 α -螺旋度为 32.8%。在分别加入 2.5 和 5mmol/L 碘乙酸条件下, 随着碘乙酸浓度的增加, 于该波数下最大负吸收明显降低, 天然酶的典型双驼峰基本消失, 并峰位明显逐渐红移。碘乙酸的加入使糖化酶的构象发生明显变化。碘乙酸为烷基化试剂, 能与酶的游离态巯基作用, 使其烷基化。可见, 巯基在维持糖化酶构象方面有重要作用。并且, 酶被烷基化后, 二硫单位对酶的构象也是有影响的。

表 1 黑曲霉糖化酶的分离纯化

提纯步骤	体积 (ml)	总蛋白 (mg)	总活力 (u)	比活力 (u/mg)	收率 (%)	提纯 倍数
粗酶液	100	4640	957276	206	100	
硫酸分级	40	1522	463938	304	48.4	1.4
DEAE-纤维素	52	86	48600	565	5.1	2.7

② Ca^{2+} 存在下的圆二色性谱: 于不同浓度 Ca^{2+} 存在下, 对糖化酶 89 000 组份的圆二色性谱分别进行了测定, 结果表明 (图 4), 在两种 Ca^{2+} 浓度条件下, 于 208 和 218nm 处, 与天然酶相比较, 最大负吸收均明显下降。在 20mmol/L Ca^{2+} 条件下, 糖化酶仍具有一定的

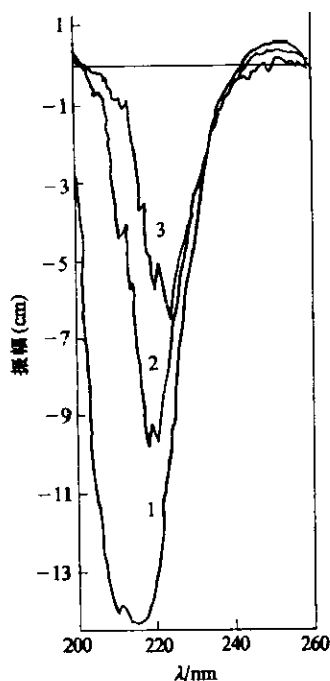
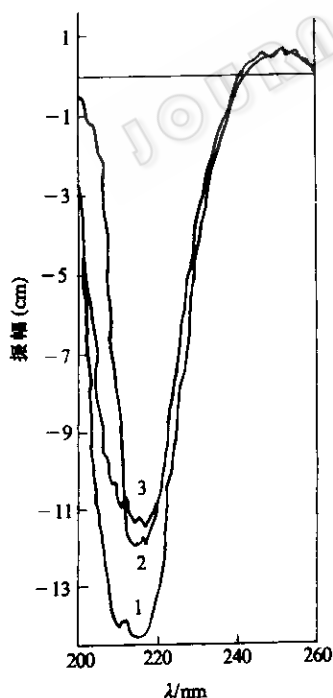


图3 碘乙酸存在下的圆二色性谱

1. 天然酶; 2. 天然酶+2.5mmol/L 碘乙酸; 3. 天然酶+5mmol/L 碘乙酸

图4 Ca^{2+} 存在下的圆二色性谱

1. 天然酶; 2. 天然酶+20mmol/L Ca^{2+} ; 3. 天然酶+1mol/L Ca^{2+}

双驼峰特征, 经计算 α -螺旋度为 18.9%。而在 1mol/L Ca^{2+} 条件下, 于该波数处双驼峰特征基本消失。同时, 于 215nm 处出现单负峰, 这可能是 β -片层结构的贡献。虽然尚未确认 Ca^{2+} 是糖化酶的辅因子, 但 Ca^{2+} 对糖化酶活力有促进作用。在一些反应中, Ca^{2+} 往往在 10~20mmol/L 浓度范围内。 Ca^{2+} 与酶分子结合后, 使酶的构象发生明显变化, 导致酶的 α -螺旋度下降。在没有 Ca^{2+} 存在时, α -螺旋度为 32.8%, 在 20mmol/L Ca^{2+} 存在时, α -螺旋度为 18.9%。看来, 糖化酶催化反应的最适构象是比较松散的。一定的 Ca^{2+}

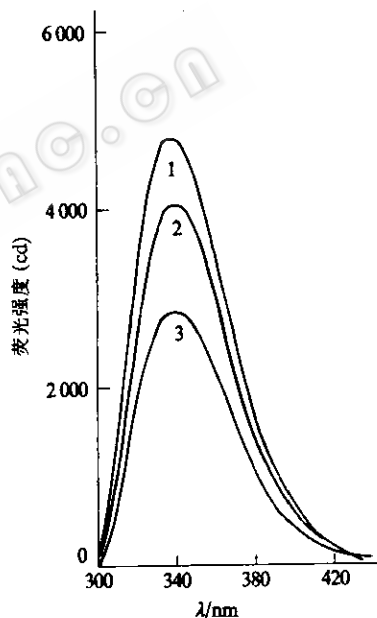


图5 碘乙酸存在下的荧光发射谱

1. 天然酶; 2. 天然酶+2.5mmol/L 碘乙酸; 3. 天然酶+5mmol/L 碘乙酸

与 E 结合后, 使其构象变得松散一些, 更有利于酶的催化反应。实验指出, 从 10 到数百 mmol/L Ca^{2+} 对糖化酶构象影响几乎无差别 (结果未列), 超过 1mol/L 浓度则有较明显影响。

2.3.2 荧光发射谱的测定

① 碘乙酸存在下的荧光发射谱: 按照前述方法, 在不同浓度碘乙酸存在下, 对酶的荧光发射谱进行了测定, 结果如图 5 所示。随着碘乙

酸浓度的增加,于 340nm 处酶的荧光发射强度明显下降。可见,碘乙酸对酶的构象具有明显影响。碘乙酸是烷基化试剂,可以修饰酶的巯基,随着环境中其浓度的增加,与酶分子的结合量也就不断增加。因此,导致参与维持酶的空间结构的巯基数量也就不断减少,使酶的构象

渐降低或接近荷电基团。

② Ca^{2+} 存在下的荧光发射谱:按照前述方法,在 20mol/L 和 1mol/L 浓度 Ca^{2+} 存在下,对酶的荧光发射谱进行了测定,结果如图 6 所示:在两种浓度 Ca^{2+} 存在条件下,于 340nm 处酶的荧光发射强度均高于天然酶该波数下的强度,并且 1mol/L Ca^{2+} 浓度下的发射强度高于 20mmol/L Ca^{2+} 浓度下的强度。看来,随着 Ca^{2+} 不断结合,使酶的构象发生了明显变化,引起酶生色基团暴露程度或其环境中疏水性得以增加。在低于 1mol/L Ca^{2+} 浓度条件下,与圆二色谱相似,各浓度下相应波数处的光谱强度相差不大。高浓度 Ca^{2+} 的影响可能更复杂些。

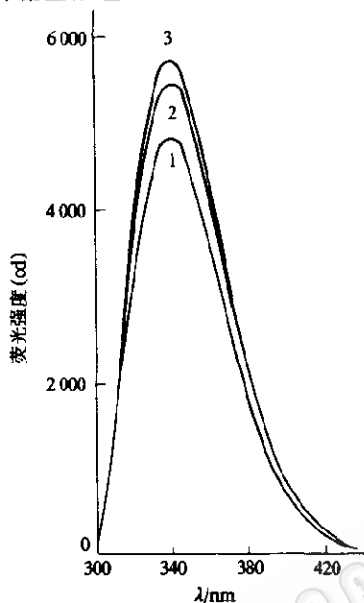


图 6 Ca^{2+} 存在下的荧光发射谱

1. 天然酶; 2. 天然酶+20mmol/L Ca^{2+} ; 3. 天然酶+1mol/L Ca^{2+}

变得比较松散,并且使生色基团环境疏水性逐

参 考 文 献

- [1] 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1989, 456~457, 508~509.
- [2] 陈陶声, 梁天锡, 胡学智等. 化学世界, 1957, 9: 385~390.
- [3] 孙晋武, 干杨声, 徐桃猷等. 微生物学报, 1983, 23(1): 44~49.
- [4] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* J Biol Chem, 1951, 193: 265~275.
- [5] Davis B J, Ann N Y. Acad Sci, 1964, 121(2): 404~427.
- [6] Weber K. J Biol Chem, 1969, 244(16): 4406~4412.

PURIFICATION AND RELATIVE SPECTRA OF GLUCOAMYLASE WITH MOLECULAR WEIGHT OF 89KD

Zhang Hailong Guan Guohua Shun Shikui
Li Zhuang Huang Chengfang

(Department of Molecular Biology, Jilin University, Changchun, 130023)

Abstract In this study, a primary component of Glucoamylase was purified by extraction, ammonium sulfate fractionation, DEAE—cellulose 52 chromatography, purity examined by PAGE was shown by the presence of a single band. In the presence of different concentrations of Ca^{2+} , iodoacetic acid or urea, circular dichroism spectra and fluorescence spectra of this component were measured. In the experiment conditions, each ligands could change the conformation of this component. These results could offer some important information about the conformation of this component.

Key words Glucoamylase, Purification, Circular dichroism spectra, Fluorescence spectra