

研究报告

粪肠球菌精氨酸脱亚胺酶酶学性质研究

李成付 李 凯 李加友 焦庆才* 刘 茜 易立涛

(南京大学生命科学院 医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

摘 要: 经硫酸铵分级沉淀、Q-Sepharose Fast Flow阴离子交换层析、SephadexG-75 凝胶柱层析从 NJ402 自溶细胞超声破碎液中提纯得到精氨酸脱亚胺酶(ADI), 纯化倍数为 34.5, 活力回收率为 31.4%, 经SDS-PAGE以及Native-PAGE测定结果表明, ADI亚基分子量约为 46 kD, 该酶非变性情况下的分子量约为 190 kD左右, 该酶为同四聚体结构。酶学性质研究结果表明: ADI催化最适温度和最适pH分别为 50℃和 6.5, 在 45℃以下和pH 5~8 之间有很好的稳定性。ADI是L-型脱亚胺酶, 具有严格的光学选择性, 适当浓度的 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 对ADI催化活力的促进作用较大, 高浓度的 Zn^{2+} 和 Co^{2+} 对酶有一定程度的抑制作用, L-瓜氨酸对酶无抑制作用而L-鸟氨酸却表现出较强的抑制作用。ADI在最佳催化条件下作用于L-精氨酸的米氏常数为 3.2686 mmol/L, 最大反应速度为 2.44 μ mol/min。

关键词: 粪肠球菌 NJ402, 精氨酸脱亚胺酶, 分离纯化, 酶学性质

The Research of Enzymology Characterization about Arginine Deiminase from *Enterococcus faecalis*

LI Cheng-Fu LI Kai LI Jia-You JIAO Qing-Cai* LIU Qian YI Li-Tao

(The State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract: Arginine Deiminase(ADI) was purified to homogeneity using ammonium sulfate precipitation, Q-Sepharose Fast Flow anion exchange chromatography and SephadexG-75 gel filtration chromatography. This purification protocol resulted in a 34.5-fold purification of ADI with 31.4% final yield. A molecular weight of about 190 kD determined by native gradient polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme has only one kind of 46 kD subunit determined by SDS-PAGE. Combining the results from the two kinds of electrophoresis, the authors deduce that the enzyme may be a tetramer. The optimum pH and temperature for lipolytic activity of ADI was pH 6.5 and 50 °C, respectively. It was extremely stable at 45 °C and retained 97.9% of its original activity for 30 min. The stability declined rapidly as soon as the temperature rose over 50 °C. ADI was highly stable in the pH range from pH 5-8. ADI acted on L-arginine but not on D-arginine. ADI catabolism was dependent on metal ions. At their adequate concentration, Mn^{2+} , Mg^{2+} and Co^{2+} were the effective promoter, while superfluous Zn^{2+} and Co^{2+} inhibited ADI activity. L-citrulline did not act on ADI, but L-ornithine inhibited ADI activity. The degradation of L-arginine with ADI catalysis was according to simple Michaelis-Menten equation. The Michaelis constant was 3.2686 mmol/L and the maxi-

mum velocity was 2.44 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

Keywords: *Enterococcus faecalis* NJ402, Arginine deiminase, Purification, Characterization

精氨酸脱亚胺酶系包括精氨酸脱亚胺酶(ADI)、鸟氨酸氨甲酰转移酶和氨甲酰磷酸激酶及其它相关酶,其中精氨酸脱亚胺酶能催化L-精氨酸转化为L-瓜氨酸^[1]。精氨酸脱亚胺酶广泛分布于细菌^[2]、古细菌^[3]和少数低等真核生物中^[4]。目前研究证实,精氨酸脱亚胺酶不但能抑制多种恶性肿瘤细胞的体外增殖,还能够抑制体内的恶性肿瘤增生^[5,6],作为一种新型抗肿瘤物质已经受到越来越多研究者的重视。

目前国外有学者从精氨酸支原体(*Mycoplasma arginini*)^[6]、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[7]、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)^[8]等微生物中分离纯化了精氨酸脱亚胺酶,其比酶活分别为:58.8 U/mg、44.5 U/mg、140.3 U/mg,国内还未见有从粪肠球菌中分离纯化精氨酸脱亚胺酶的报道。本实验室筛选得到了产精氨酸脱亚胺酶的新菌株——粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)NJ402,发现该菌株安全性好,易于发酵制备,有利于精氨酸脱亚胺酶的大规模生产和临床应用。从自溶的NJ402菌体中提取得到精氨酸脱亚胺酶,对该酶动力学和热力学性质进行研究,为该酶的实际应用提供依据。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器: 菱光 722 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),高速低温离心机(日本 Hitachi 公司),数显恒温水浴锅 HH-2(国华电器有限公司),恒温水浴振荡器 SHZ88.1(江苏太仓),AnkeTDL80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),超声破碎仪(美国 SONICS & MATERIALS 公司)。

1.1.2 菌株: *Enterococcus faecalis* NJ402: 由本实验室以粪肠球菌(*E. faecalis*)为出发菌株,经复合诱变得到的。

1.1.3 发酵基本培养基(g/L): 牛肉膏 2.5, 蛋白胨 10, 酵母浸膏 5, 蔗糖 10, NaCl 3, KH_2PO_4 2, L-精氨酸 5, pH 7.5, 1×10^5 Pa灭菌 15 min。

1.1.4 试剂: 二乙酰一肟,牛血清白蛋白,磷酸,硫酸,考马斯亮兰, Q-Sepharose Fast Flow, Sephadex-G-75, CoSO_4 , MnSO_4 , CuSO_4 , MgCl_2 , ZnSO_4 , 所有试剂均为市售生化试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 ADI 分离纯化: 将培养好的 NJ402 菌体发酵液经 5000 r/min 离心处理后,收集湿菌体 4 保存。将自溶菌体配成浓度为 100 mg/mL 菌悬液,经过低温超声破碎细胞(功率 130 W、破碎全程时间 15 min、间歇时间 15 min),10000 r/min 离心 15 min,取上清,60%~70%硫酸铵分级盐析,沉淀经 pH 7.2, 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液透析脱盐,透析液过 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱,先用 pH 7.2, 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡柱子,再用相同缓冲液配制的 0 mol/L~0.5 mol/L 的 NaCl 梯度洗脱,流速为 0.5 mL/min,收集各个洗脱峰,对收集的溶液进行酶活性测定。酶活力部分用 pH 7.2, 10 mmol/L Tris-HCl 平衡的 Sephadex-G-75 凝胶柱层析,洗脱流速 0.1 mL/min,收集酶活力组分,冷冻干燥,得到电泳纯 ADI。

1.2.2 ADI 活力测定: 改进的阿氏法^[9]。0.1 mL 酶液加入 2 mL 磷酸缓冲液配制的 0.5 mol/L 精氨酸溶液(pH 7.0)中,37 °C 下恒温反应 30 min(除特别说明,条件均为温度 37 °C, pH 7.0),用 10%三氯乙酸 1 mL 终止反应,4000 r/min 离心 2 min,测定上清液中 L-瓜氨酸的含量。

酶活定义:在 1 min 时间内产生 1 μmol L-瓜氨酸所需的酶量为一个酶单位(1 U)。

比酶活定义:1 mg 的蛋白质所含活力单位数(U/mg)。

1.2.3 蛋白含量测定: 采用考马斯亮兰法,标准蛋白为牛血清白蛋白。

1.2.4 分子量测定: Native-PAGE(非变性聚丙烯酰胺梯度胶电泳)依据 Lambin 和 Fine^[10]的方法,用以测定全酶分子量,SDS-PAGE 用以测定亚基分子量。

2 结果及讨论

2.1 酶的分离纯化与分子量的测定

按上述方法得到 ADI 酶,每一步所得的 ADI 酶液基本情况见表 1。

NJ402 菌体自溶后,超声破碎,破碎液经 60%~70%硫酸铵分级盐析, Q-Sepharose Fast Flow 层析, Sephadex-G-75 层析后,得到的 ADI 纯化 34.5

表 1 ADI 纯化基本情况
Table1 The Purification of the ADI

提纯步骤 Purification step	总蛋白含量 Total protein (mg)	总酶活 Total activity (U)	比酶活 Special activity (U/mg)	回收率 Yield (%)	纯化倍数 Purification fold
粗提液 (Crude extract)	2255	536.6	0.2383	100	1.00
硫酸铵盐析 (ammonium sulfate precipitation)	170.2	413.2	2.428	77.0	10.2
Q-Sepharose fast flow 层析 (Q-Sepharose fast flow)	55.93	300.5	5.380	56.3	22.6
SephadexG-75 层析 (SephadexG-75)	20.52	168.5	8.212	31.4	34.5

倍，回收率为 31.4%，冰冻干燥后测得酶粉相对酶活为 8.151 U/mg。图 1 的 SDS-PAGE 以及 Native-PAGE 测定结果表明，ADI 亚基分子量约为 46 kD，该酶非变性情况下的分子量约为 190 kD 左右，推测该酶为同四聚体结构。

2.2 酶学性质研究

2.2.1 温度对 ADI 酶活力影响：以 0.5 mol/L L-精氨酸作为底物，转化反应 pH 值控制在 7.0(磷酸盐缓

冲液)，在 20 ~70 温度范围内测定酶活力，结果如图 2 所示：随着温度的升高，酶促反应速率增大，在 50 时酶促反应速率达到最大，当温度超过 50 以后，酶促反应速率迅速下降，因此认为，ADI 最适酶促反应温度为 50 。

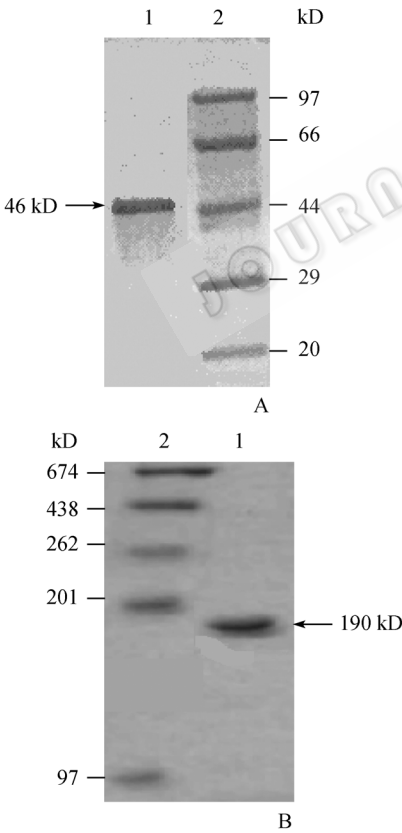


图 1 ADI 电泳谱图
Fig. 1 Electrophoresis map of the ADI
Note: A: SDS-PAGE; B: Native-PAGE; 1: Arginine Deiminase; 2: Marker

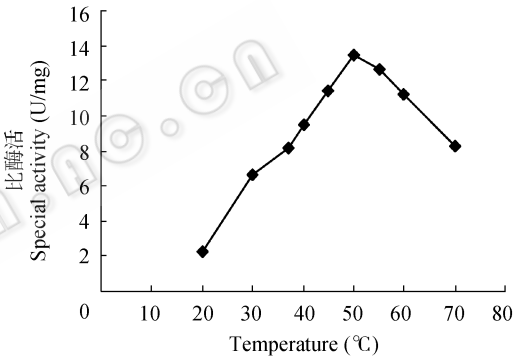


图 2 温度对 ADI 活力影响
Fig. 2 Effect of the temperature on enzyme activity

2.2.2 温度对 ADI 稳定性影响：将 ADI 酶液催化体系分别在 37 , 45 , 50 , 60 , 70 恒温处理后，于酶活测定体系测不同时间段酶活的保留。结果如图 3 所示：未保温处理的酶液比酶活为 8.154 U/mg，酶液在 37 持续处理 3 h 后，酶促反应速率并无明显下降，更进一步的实验表明，在 37 条件下，ADI 稳定性非常高，放置 24 h，酶活仅损失 6%。当酶液置于其最适催化反应温度 50 恒温处理 1 h 后，酶活损失 13%，酶液于 45 下保温 3 h 酶活损失 17.6%，50 下保温 3 h，60 下保温 1 h 后就检测不到酶活，可见酶的耐热性较差。

2.2.3 pH 对 ADI 酶活力影响：将 ADI 酶液置于由不同 pH 缓冲液配制的转化体系中，测定不同 pH 对 ADI 催化反应的影响，结果如图 4 所示：在 pH 值为 6~7 之间时，酶促反应速率最大，即最适 pH 为 6~7，

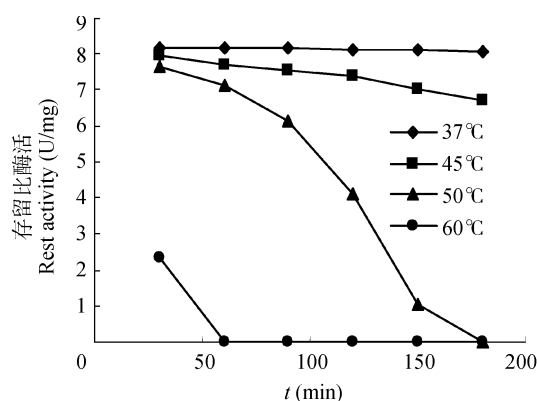


图3 ADI 热稳定性

Fig. 3 Thermostability of ADI

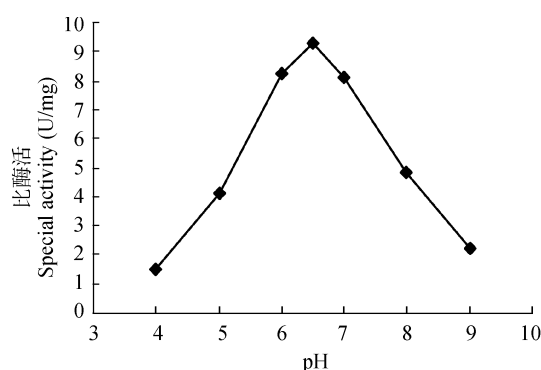


图4 pH 对 ADI 活力影响

Fig. 4 Effect of pH on the enzyme activity

进一步精确测定得到 ADI 的最适催化 pH 条件为 pH 6.5, 酶在强酸强碱条件下活力很低, 在 pH4 及 pH9 时酶活力分别只有最大值的 16%和 24%。

2.2.4 pH 对 ADI 稳定性影响: ADI 酶液分别置于不同的 pH 缓冲液中, 4 放置 3 h, 用 NaOH 或 HCl 调节至 pH 6.5, 37 条件下测定 ADI 保留酶活力, 以所得最大催化效率为 100%, 结果如图 5 所示: ADI 在 pH 5~8 之间相对稳定, 超过此范围酶活力受 pH 影响下降较为显著, 在 pH 4 及 pH 9 条件下放置 3 h 后酶活力分别只有最大值的 40%和 36%。

2.2.5 金属离子对 ADI 活力影响: 不同金属离子分别加入到 ADI 酶液中, 金属离子终浓度依次为 0.01 mmol/L、0.1 mmol/L、1.0 mmol/L、10 mmol/L 和 100 mmol/L, 37 下保温 1 h 测定酶活力。结果如图 6 所示, Cu^{2+} 对酶活无影响, 低浓度的 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 和 Zn^{2+} 对 ADI 酶活无影响, 适当浓度的 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Co^{2+} 对 ADI 酶活力的促进作用较大, 高浓度 Zn^{2+} 和 Co^{2+} 对 ADI 有一定程度的抑制作用。

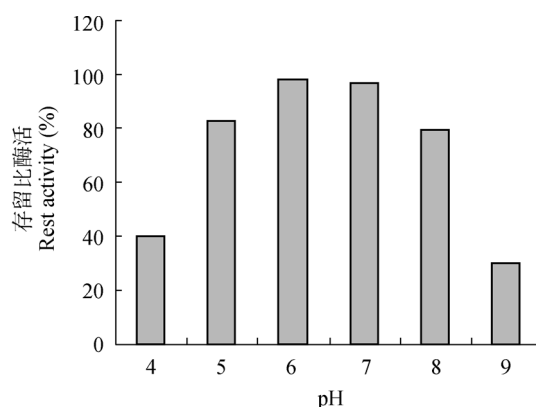


图5 pH 对 ADI 稳定性影响

Fig. 5 Effect of pH on ADI

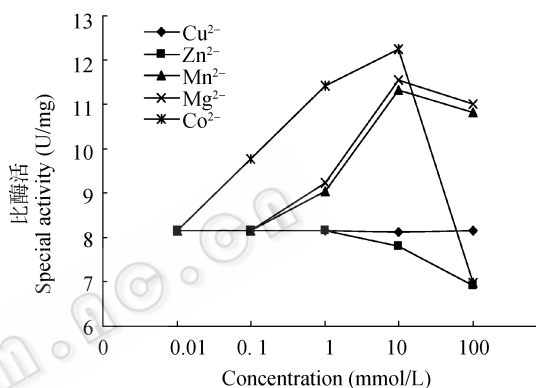


图6 金属离子对 ADI 活力影响

Fig. 6 Effect of metal ion on the enzyme activity

2.2.6 ADI 底物特异性和立体选择性: 分别以 L-、D-精氨酸作为底物, 测定 ADI 对不同作用底物的选择性。结果表明, ADI 是严格的 DL-立体选择性脱亚胺酶, 只有以 L-精氨酸为底物才会产生脱亚氨基的作用, 完全不作用于 D-精氨酸, 该酶可以作用于外消旋的 DL-精氨酸以制备 D-精氨酸。

2.2.7 L-瓜氨酸与L-鸟氨酸对ADI活力影响: 文献报道L-鸟氨酸是ADI的非竞争性抑制剂^[11], 而通常可知, 酶作用产物对酶催化反应速度会有相应影响。因此, 分别考察了转化体系中不同浓度的L-鸟氨酸和L-瓜氨酸对NJ402 ADI酶活力的影响。图 7 结果表明, 转化体系中L-瓜氨酸并不对NJ402 ADI 的酶促反应产生影响, 而L-鸟氨酸对NJ402 ADI酶活有明显的抑制作用。

2.2.8 ADI 动力学常数 K_m 和 V_{max} : 配制 5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、25 mmol/L、50 mmol/L 和 100 mmol/L 的 L-精氨酸溶液 2 mL, 加入 ADI 酶溶液 0.1 mL, 于 pH6.5, 50 下测定酶活力。ADI 作用

于L-精氨酸时初始反应速度和底物浓度的关系表明NJ402 ADI催化L-精氨酸脱亚胺反应遵循简单的Michaelis-Menten动力学方程。用Lineweaver-Burk法——酶促反应的初速度和底物初浓度的双倒数法作图,结果如图8所示,即可求得ADI酶对L-精氨酸的米氏常数和最大反应初速度。为了得到较为准确的结果,采用了较高浓度底物,并且 $1/[S]$ 分两部分设计成等比值^[12]。由此所得的 K_m 为3.2686 mmol/L,最大反应速度2.44 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。

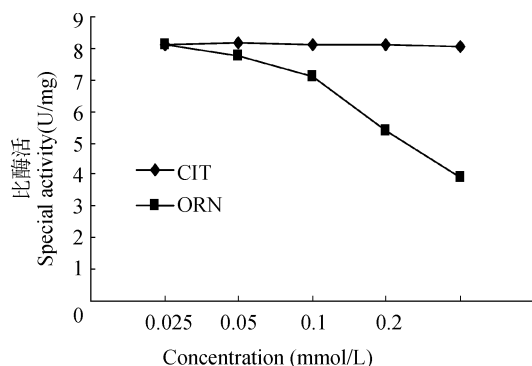


图7 L-瓜氨酸和L-鸟氨酸对ADI活力的影响

Fig. 7 Effect of L-citrulline and L-ornithine on ADI activity

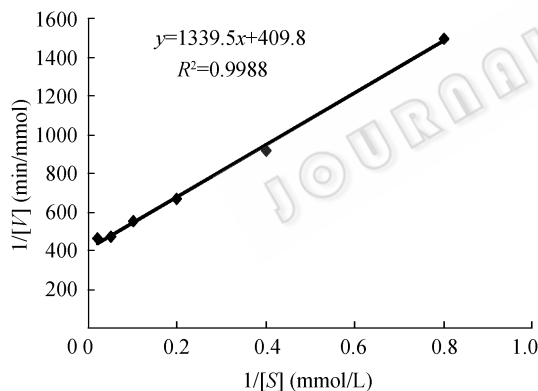


图8 ADI酶促反应动力学

Fig. 8 Kinetics of ADI biocatalysis

2.3 讨论

经硫酸铵分级沉淀、Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析、SephadexG-75 凝胶柱层析从本实验室筛选得到的产精氨酸脱亚胺酶的新菌株——粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)NJ402 自溶细胞超声破碎液中提纯得到精氨酸脱亚胺酶,纯化倍数为34.5,活力回收率为31.4%,其比酶活为8.151 U/mg,该酶的相对分子质量(190 kD 左右)、最适反应温度(50)、最适pH值(6.5)等特性,与国外文献已报道的不同来源的精氨酸脱亚胺酶有差异^[6-8],这些差异

的产生,是由于不同菌株产酶的性质不同引起的。由SDS-PAGE以及Native-PAGE测定结果推测该酶为同四聚体结构,这与文献报道相同^[13]。

参考文献

- [1] Gilbert CS, Milan AL, Alfred AT. The degradation of arginine by *Clostridium perfringens* (BP6K). *Journal of Biological Chemistry*, 1952, **198**: 771-783.
- [2] Stalon V, Simon JP, Mercenier A. Enzymes of arginine utilization and their formation in *Aeromonas formicans* NCIB 9232. *Archives of Microbiology*, 1982, **133**(4): 295-299.
- [3] Monstadt GM, Holldorf AW. Arginine deiminase from *Halobacterium salinarum* purification and properties. *Biochemical Journal*, 1991, **273**(3): 739-745.
- [4] Knodler LA, Schofield PJ, Edwards MR. L-Arginine transport and metabolism in *Giardia intestinalis* support its position as a transition between the prokaryotic and eukaryotic kingdoms. *Microbiology*, 1995, **141**(9): 2063-2070.
- [5] Park IS, Kang SW, Shin YJ, et al. Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *British Journal of Cancer*, 2003, **89**(5): 907-914.
- [6] Takaku Ha, Takase M, Abe S, et al. In vivo antitumor activity of arginine deiminase purified from *Mycoplasma arginini*. *International Journal of Cancer*, 1992, **51**(2): 244-249.
- [7] Shibatani T, Kakimoto T, Chibata I. Crystallization and properties of L-arginine deiminase of *Pseudomonas putida*. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, **250**(12): 4580-4583.
- [8] Kim JE, Jeong DW, Lee HJ. Expression, purification, and characterization of arginine deiminase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962 in *Escherichia coli* BL21. *Protein Expression and Purification*, 2007, **53**(1): 9-15.
- [9] 李加友, 曹瑜, 焦庆才. 酶法转化液中L-瓜氨酸的分光光度法测定. *分析实验室*, 2005, **24**(12): 8-10.
- [10] Lambin P, Fine JM. Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in linear polyacrylamide gradient gels in the absence of denaturing agents. *Analytical Biochemistry*, 1979, **98**(1): 160-168.
- [11] Manca N, Aida A, Oliver G. Isolation and properties of arginine deiminase in *Lactobacillus buchneri* NCDO110. *Journal of Applied Biochemistry*, 1984, **6**(3): 184-187.
- [12] 李再资. 生物工程与酶催化. 广州: 华南理工大学出版社, 1995, pp.92-121.
- [13] Andrey Glakin, Liudmila Kulakova, Elif Sarikaya, et al. Structural insight into arginine degradation by arginine deiminase, an antibacterial and parasite drug target. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(14): 14001-14008.