

# 来自基因工程菌 *E.coli* BL21/pET-DsbA-MalQ 的麦芽糖转糖基酶的分离纯化及酶学性质研究

王水兴<sup>1</sup>, 龚 珩<sup>2</sup>, 郭 勇<sup>3</sup>, 夏慧玲<sup>1</sup>, 吴凌伟<sup>1</sup>

(1. 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047;

2. 九江学院医学院, 江西 九江 332005; 3. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510641)

**摘 要:** 通过 6-His 的分离标签, 联合采取硫酸铵沉淀, 生物半透膜透析和亲和层析等方法, 纯化了目标酶。通过使用凝血酶切割 DsbA-MalQ 融合蛋白, 证明酶切后酶蛋白仍具有麦芽糖转糖基酶活性。该酶的最适温度为 37℃, 最适 pH 值为 6.5。当处理温度小于 40℃ 时, 酶的活力基本保持在最高活性的 80% 以上, 相对稳定; 在酶的 pH 耐受方面, 在 pH 5.5~8.0 范围内较稳定。金属离子和 EDTA 对酶活性的影响实验表明, EDTA 对酶活的影响不大, 但  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Ag^{+}$  对酶蛋白有较强的抑制作用, 而  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  等对表达的酶有一定的激活作用。在 37℃, pH6.5 时以麦芽三糖为底物测得酶促反应的  $K_m$  值为 0.378mmol/L,  $V_{max}$  值为 1.979mmol/(L·min)。

**关键词:** 麦芽糖转糖基酶; 酶学性质; 纯化; 亲和层析

## Purification and Characterization of Amylomaltase from Genetic Engineer Strain *E. coli* BL21/pET-DsbA-MalQ

WANG Shui-xing<sup>1</sup>, GONG Heng<sup>2</sup>, GUO Yong<sup>3</sup>, XIA Hui-ling<sup>1</sup>, WU Ling-wei<sup>1</sup>

(1. Jiangxi-OAI Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Medical College, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China;

3. College of Bioscience and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

**Abstract:** The fusion protein was purified by Ni-NTA His-Bind affinity chromatography and cut with thrombin. The purified protein had 4- $\alpha$ -glucanotransferase activities. Its optimum pH and optimum temperature were 37 °C and pH 6.5, respectively. When the enzyme was treated at different temperature or pH, the enzyme activity would show different. When the treated temperature was over 40 °C or the treated pH below 4.5 or over 9.0, the enzyme activity would decrease quickly. Influences of ions and EDTA on enzyme activity were studied. The results showed that ions  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^{+}$  inhibited enzyme activity, ion  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  increased the enzyme activity, while EDTA showed no such effects on the enzymes. The  $K_m$  and  $V_{max}$  were 0.378 mmol/L and 1.979 mmol/(L·min), respectively.

**Key words** amylomaltase; characterization of enzyme; purification; affinity chromatography

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0258-05

环状糊精是淀粉经酶降解环化的产物, 具有筒状疏水内腔, 可以包含多种适当大小的疏水性物质并形成包合物, 改变客体分子的水溶性、稳定性、挥发性和流变学特性等。在食品上用于改善风味和口味, 并用于包埋去除一些有害物质。经过数十年的研究和开发, 已经在医药、食品、轻工、化工以及农业等方面获得了

广泛的应用<sup>[1-2]</sup>。现在工业中所用的环状糊精主要是  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ - 环状糊精及其衍生物, 尤其以  $\beta$ - 环状糊精应用最为广泛。区别于上述环状糊精的大环糊精是指聚合度从 9 到几百不等的环状葡聚糖。因其潜在的工业应用价值, 在最近不到 10 年的时间里, 越来越多的学者开始关注并致力大环糊精的研究<sup>[3-6]</sup>, 可以预见, 大环糊精

收稿日期: 2007-07-30

基金项目: 江西省教育厅项目(赣财教[2004]18号-18)

作者简介: 王水兴(1963-), 男, 副教授, 博士, 主要从事食品生物技术研究。

的工业化不仅可以开辟一类新的淀粉深加工产品,而且可以为食品、医药、化工、印染、农药等行业提供一种智能化的分子级微胶囊壁材。合成大环糊精的酶是麦芽糖转糖基酶(amyloamylase EC2.4.1.25)。本实验对利用前期构建的基因工程菌制备的麦芽糖转糖基酶进行纯化,并系统研究该酶在不同的温度、pH 环境里的酶活力和稳定性,同时研究酶的反应动力学,将为进一步利用该酶制备大环糊精提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

#### 1.1.1 菌种

基因工程菌 *E. coli* BL21/pET-DsbA-*MalQ*(本课题组构建)。

#### 1.1.2 化学试剂

PMSF、胃蛋白酶抑制剂、麦芽三糖、凝血酶 Sigma 公司;葡萄糖检测试剂盒 上海荣盛生物技术有限公司;其他化学试剂购于专业化学试剂公司。

#### 1.1.3 仪器

752分光光度计 上海分析仪器总厂;电子天平(EK-120G 型) 日本 AND 公司;超速冷冻离心机(J2-21) Beckman, USA;水浴锅(3041 型) 德国 KOTTERMANN 公司;pH 计(320S 型) METTLER TOLEDO 公司;微量移液器 Finland Labsystem 稳压稳流电泳仪(DDY-2)、垂直电泳槽 北京市六一仪器厂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养基和缓冲液

50mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.2): 3.4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  磷酸二氢钾和 8.95g 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  溶于适量的蒸馏水中,最后定容到 500ml,存于 4℃ 冰箱备用。

50mmol/L 醋酸缓冲液(pH5.5): 88ml 的 0.2mol/L 醋酸钠和 12ml 的 0.2mol/L 醋酸混合后用蒸馏水定容到 500ml,存于 4℃ 冰箱备用。

#### 1.2.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀<sup>[7]</sup>

向粗酶液中加入固体  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至含量达 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%,边加边搅拌,搅拌 1h,使相应的蛋白沉淀。于 10000r/min 4℃ 离心 30min,取上清液。

#### 1.2.3 透析脱盐处理

用 10mmol/L 碳酸氢钠和 1mmol/L 的 EDTA 溶液煮沸透析袋 30min,煮沸之后,用双蒸水充分洗涤透析袋,洗毕,存于 1mmol/L EDTA 溶液中,4℃ 保存备用。将适量样品倾入透析袋,浸没于 50mmol/L 磷酸缓冲液中,4℃ 磁力搅拌 12h,每隔 4h 更换一次缓冲液,直至透析

完成,4℃ 保存备用。

#### 1.2.4 Ni-NTA 柱亲和层析

所表达的基因工程重组蛋白带有一个 His-tag 标签,可用 Ni-NTA-树脂柱进行亲和层析纯化。将透析后的粗酶液经微孔膜过滤后注入 Ni-NTA 亲和层析柱,上样完毕后静置 2h,以便 His-tag 标签与填料中  $\text{Ni}^{2+}$  充分结合然后用洗涤缓冲液洗涤,分别用 10 倍柱体积的结合缓冲液和 6 倍柱体积的漂洗缓冲液(30mmol/L 咪唑、0.5mol/L NaCl、20mmol/L Tris-HCl, pH7.9)过柱以洗去未结合的杂蛋白,加入溶菌酶溶液,放置 24h,使用缓冲液洗涤,流速 0.5ml/min,以每管 1ml 分部收集。检测不同收集管中转移酶活性,取活力高的组分并管,收集酶活的峰值部分加入 10% 甘油后用 2L 的 50mmol/ml 磷酸缓冲液(pH7.2)作为介质在 4℃ 用生物半透膜透析下缓慢透析 24h,以充分脱盐。以 SDS-PAGE 凝胶电泳检测纯度。

#### 1.2.5 SDS-PAGE 鉴定酶的纯度和测定酶的分子量

酶纯度的鉴定和分子量的测定采用 SDS-PAGE 方法进行。将纯化的酶液作为样品溶液,先与 2 倍上样缓冲液混合,SDS-PAGE 分析,进行恒流电泳,分离胶浓度 7.5%,浓缩胶浓度 5.0%,电泳条件为浓缩胶电流 10mA,分离胶电流 30mA,电泳后的分离胶用考马斯亮蓝 R-250 染色,标准蛋白质用广泛标准蛋白 Marker,根据样品和标准蛋白的 SDS-PAGE 图判断目标蛋白的分子量。

#### 1.2.6 不同温度对酶活影响

调节反应混合液的 pH 为 6.0,分别将反应混合液置于 20、25、30、35、40、45、55、65℃ 下反应 30min,100℃ 水浴 10min 终止反应,采取葡萄糖氧化酶法分析样品葡萄糖量,以最高的酶活力为 100%,其余条件下的酶活力与其比较换算成相对酶活。

#### 1.2.7 不同 pH 值对酶活的影响

分别将反应混合液的 pH 值调成 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5, pH 介于 3.5~7.0 使用 50mmol/L 醋酸缓冲液作为缓冲体系; pH 介于 7.0~9.0 使用 50mmol/L 磷酸缓冲液作为缓冲体系。将反应液置于 30℃ 水浴温育 30min,以最高的酶活力为 100%,其余条件下的酶活力与其比较换算成相对酶活。

#### 1.2.8 温度对酶的稳定性影响

分别将酶置于 20、30、40、50、60、70℃ 保温 2h,取出后存于 4℃ 冰箱备用。将保温处理的酶液加入到反应体系里,体系的 pH 值为 6.5。将反应液置于 40℃ 水浴温育 30min,以最高的酶活力为 100%,其余条件下的酶活力与其比较换算成相对酶活。

#### 1.2.9 pH 值对酶的稳定性影响

将酶液分别加入到 pH3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、

8.5、9.5的缓冲体系里室温放置2h,然后存于4℃冰箱备用。将经过不同pH处理的酶液加入到pH值为6.5的反应体系中,将反应液置于40℃水浴温育30min,以最高的酶活力为100%,其余条件下的酶活力与其比较换算成相对酶活。

#### 1.2.10 EDTA和金属离子对酶活的影响

选用 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 等几种离子和EDTA为因子,使反应液中各种金属离子和EDTA的最终浓度为2mmol/L,在35℃放置10min。将经过不同离子处理的酶液加入到pH值为6.5的反应体系中。

#### 1.2.11 酶蛋白动力学参数测定

在30℃下,固定酶的量,以不同浓度的麦芽三糖溶液为底物,测定酶的反应速度。采用双倒数作图法,测定酶对麦芽三糖的 $K_m$ 值和 $V_{max}$ 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 硫酸铵沉淀蛋白

硫酸铵盐析沉淀蛋白是利用不同的蛋白质在不同的盐浓度条件下溶解度不同的特性,通过在酶液中加入一定量的硫酸铵,使酶和杂蛋白分级沉淀分离。由图1可以看出,当硫酸铵的饱和度小于70%时,表达的目标蛋白基本没有沉淀,上清液酶活基本维持在95%以上,而当硫酸铵的饱和度大于70%时,随着盐浓度的升高,酶蛋白迅速沉淀,当盐饱和度达到80%时,酶蛋白基本沉淀。

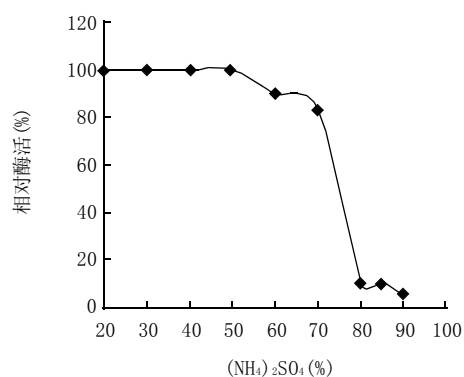


图1  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的饱和度对表达产物沉淀的影响

Fig.1 Relationship between concentration of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and enzyme activity of supernatant

### 2.2 亲和层析纯化目标蛋白

亲和层析法是分离蛋白质的一种极为有效的方法,它经常只需经过一步处理即可使某种待提纯的蛋白质从很复杂的蛋白质混合物中分离出来,而且纯度很高。这种方法是根据某些蛋白质与另一种称为配体的分子能特异而非共价地结合。尽管蛋白质在组织或细胞中是以复

杂的混合物形式存在,每种类型的细胞都含有上千种不同的蛋白质,但可以通过亲和层析使蛋白质得到分离、提纯甚至鉴定。由于本实验构建的基因工程菌表达出的蛋白质带有6-His标签,可用Ni-NTA进行亲和柱层析来提纯表达出的蛋白质,将不含有6-His标签的蛋白质除去。纯化后的目标蛋白经SDS-PAGE电泳分析,获得单一的条带(图2),其分子量与预计*MalQ*基因翻译的蛋白78.5kDa基本一致。

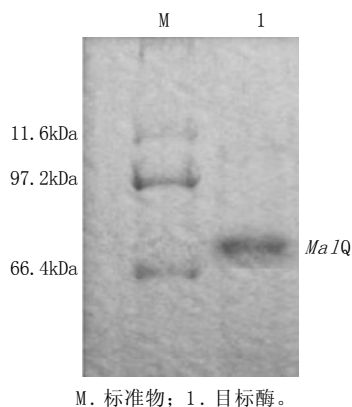


图2 分离纯化的目标酶电泳图

Fig.2 SDS-PAGE analysis of purified enzyme

### 2.3 最适温度的研究

酶促反应中,温度高于最适温度时,引起的酶变性而降低反应速度;在温度低于最适温度时,酶的反应速度随温度升高而增加。为了确定酶的最适反应温度,研究了温度对酶活性的影响。在pH7.0的条件下,于20~65℃温度范围内按照标准方法测定酶活,研究不同温度对酶活力的影响,以酶活最高者为100%。由图3可以看出,酶在35~45℃温度范围内酶活稳定,其最适温度为37℃,随着温度的升高酶活下降显著,至65℃时剩下30%左右的酶活。

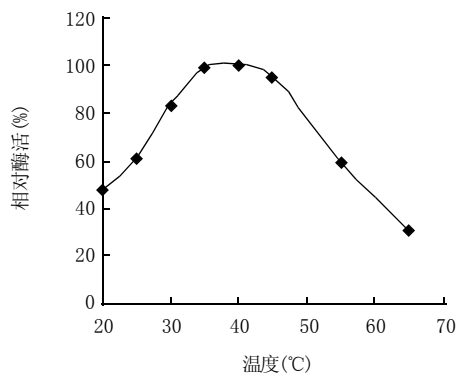


图3 温度对酶活力的影响

Fig.3 Effects of temperature on enzyme activity

### 2.4 酶最适pH的研究

酶是两性化合物,其上分布着许多羟基和氨基等酸性和碱性基团,pH的变化会引起底物分子的解离状态变化;酶分子的解离状态变化;中间复合物的解离状态变化,从而引起酶活力的变化。为了使酶在酶促反应时具有高的活性,使反应在最适pH附近进行。将酶液与不同pH缓冲液配置的底物溶液进行反应。由于pH范围不同,所以选用的缓冲液也不同。pH介于3.5~7.0使用50mmol/L醋酸缓冲液;pH介于7.0~9.0使用50mmol/L磷酸缓冲液,以酶活最高者为100%。由图4中酶活随pH变化的趋势可以看出,相对酶活高于80%时,麦芽糖转糖基酶在pH 5.5~8.0范围内活力稳定,酶的最适pH值都在6.5左右。此外,当pH小于4.5时,酶活都很低,为最高酶活的30%左右。

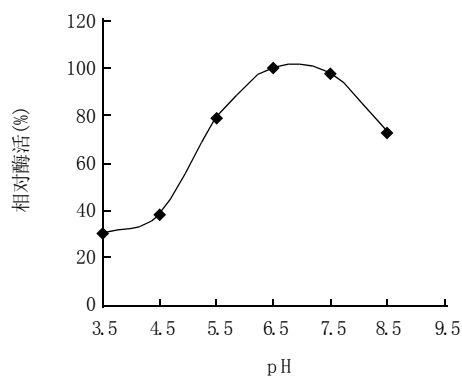


图4 pH值对酶活的影响

Fig.4 Effects of pH values on enzyme activity

## 2.5 酶的热稳定性研究

酶活力的下降与其在一定温度下停留的时间有关,如果温度较高,在极短的时间处理酶,对酶的活性影响比长时间要小,但当处理时间足够长,则酶的活力与温度呈负相关。在相对稳定的pH值下,分别测定酶在最适pH值时对酶的热稳定性。将酶液与50mmol/L磷酸缓冲液分别在不同温度下(20~70℃)保温2h后,立即在4℃冰箱中冷却,然后按照标准方法测定酶活,以未经保温处理的酶活为100%,由此确定酶的热稳定性。由图5的结果可以看出,当处理温度小于45℃时,酶的活力基本保持在最高活性的80%以上,相对稳定。当处理温度高于50℃时,酶活力急剧下降,当处理温度为70℃时,两个来源的酶的相对活力均降到10%以下,酶基本失活。

## 2.6 酶的pH稳定性研究

酶的pH稳定性如图6,麦芽糖转糖基酶的pH稳定范围较宽,在pH 5.5~8.5范围内较稳定,酶蛋白在pH6.5~8.0酶活基本不变。

## 2.7 金属离子和EDTA对酶活性的影响

金属离子对酶活性的影响是多方面的,有些金属离

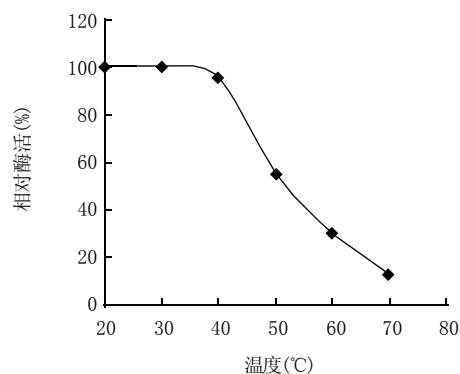


图5 酶的温度稳定性

Fig.5 Temperature stability of enzyme

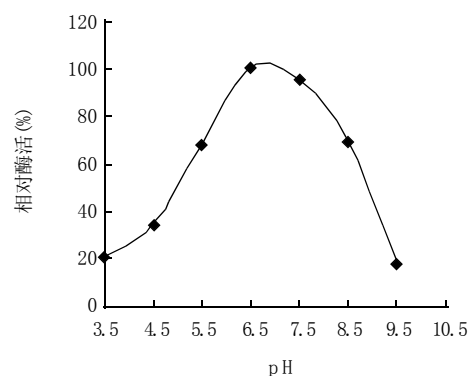


图6 酶的pH值稳定性

Fig.6 pH values stability of enzyme

子是某些酶分子中的一部分,失去金属离子,酶的活性就会丧失,有些酶本身并不含有金属离子,但是金属离子对酶有激活作用或抑制作用,还可能影响酶的稳定性。正因为某些金属离子可能是酶的抑制剂或激活剂,故有必要探讨各种离子与酶活力的关系,为麦芽糖转糖基酶的研究、生产、应用提供依据。金属离子对酶活的影响如图7所示,该酶EDTA影响较小,所以,在酶的前处理中,接触到EDTA基本不会影响后续酶的活性。但 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Ag^{+}$ 对酶蛋白有强烈的抑制作用,阻抑作用最明显的是 $Hg^{2+}$ 、 $Ag^{+}$ 。 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、

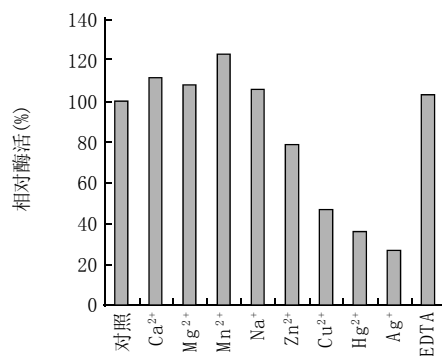


图7 金属离子和EDTA对酶活的影响

Fig.7 Effects of ions and EDTA on enzyme activity

$Mn^{2+}$  等对实验的酶有一定的激活作用,  $Na^{+}$  比较特殊, 其对麦芽糖转糖基酶有一定的激活作用。

### 2.8 酶促反应动力学

米氏方程是酶促反应的基本动力学方程, 可以确定酶的反应速度和底物浓度之间的关系, 在酶动力学中, 米氏常数  $K_m$  是酶的一个特征常数,  $K_m$  的物理意义是指酶的活性中心一半被底物结合所需的底物浓度,  $K_m$  值越小, 表面酶与底物的亲和力越强。测定酶的  $K_m$  最常用的方法是双倒数作图法。通过测定表达的麦芽糖转糖基酶在最适 pH、温度条件下, 在一系列的麦芽三糖浓度下的反应速度, 利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 以  $1/[S]$  为横坐标,  $1/V$  为纵坐标作图(图 8), 横坐标的截距为  $-1/K_m$ , 由此求得麦芽三糖为底物时, 麦芽糖转糖基酶的  $K_m$  值为  $0.378\text{mmol/L}$ ,  $V_m$  值为  $1.979\text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

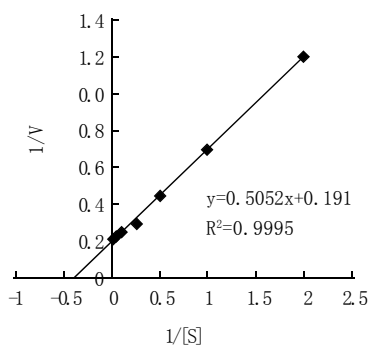


图 8 麦芽三糖与麦芽糖转糖基酶活性关系的双倒数图

Fig.8 Double reciprocal plot of relationship of maltotriose to amylomaltase activity

### 3 结 论

利用基因表达产物带有一个 6-His 的标签, 通过亲和层析法进行纯化, 为酶学性质研究和分离工作提供了便利。通过详细研究该酶在不同的温度、pH 环境里的酶活力和稳定性以及酶的反应动力学, 主要得到了如下结果:

3.1 通过硫酸铵沉淀、生物半透膜透析脱盐和亲和层析法纯化了表达的麦芽糖转糖基酶, 并证实了其活性。

3.2 探讨了反应温度对麦芽糖转糖基酶酶活的影响, 发现该酶的最适温度为  $37^{\circ}\text{C}$ ; 探讨了反应体系的 pH 值对酶活性的影响, 发现麦芽糖转糖基酶在 pH 介于  $5.5 \sim 8.0$  时酶活基本稳定, 其最佳 pH 值为 6.5。

3.3 探讨了酶的温度稳定性, 当处理温度小于  $40^{\circ}\text{C}$  时, 酶的活力基本保持在最高活性的 80% 以上, 相对稳定。当处理温度高于  $50^{\circ}\text{C}$  时, 酶活力急剧下降; 探讨了酶的 pH 稳定性, 酶的 pH 稳定范围较宽, 在 pH  $5.5 \sim 8.0$  范围内较稳定。

3.4 探讨了金属离子和 EDTA 对酶活性的影响, EDTA 对酶活的影响不大, 但  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Ag^{+}$  对酶蛋白有较强的抑制作用, 而  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  等对表达的酶有一定的激活作用。

3.5 以麦芽三糖为底物时, 麦芽糖转糖基酶的  $K_m$  值为  $0.378\text{mmol/L}$ ,  $V_{max}$  值为  $1.979\text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

### 参考文献:

- [1] MEMISOGLU E, BOCHOT A, SEN M, et al. Amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrins modified on the primary face: synthesis, characterization, and evaluation of their potential as novel excipients in the preparation of nanocapsules[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002, 91(5): 1214-1224.
- [2] WANG Z, HIRAYAMA F, UEKAMA K. Design and *in vitro* evaluations of a modified-release oral dosage form of nifedipine by hybridization of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins and hydroxypropyl cellulose[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1993, 45: 942-946.
- [3] TAKAHA T, YANASE M, TAKAA H, et al. Cyclic glucans produced by the intramolecular transglycosylation activity of potato D-enzyme on amylopectin[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 247: 493-497.
- [4] TERADA Y, FUJII Y, TAKAHA T, et al. Thermus aquaticus ATCC 33923 amylomaltase gene cloning and expression and enzyme characterization: production of cycloamylose[J]. Applied Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 910-915.
- [5] TOMONO K, MUGISHIMA A, SUZUKI T, et al. Interaction between cycloamylose and various drugs[J]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2002, 44: 267-270.
- [6] 王水兴, 郭勇, 许杨. 大环糊精及其在食品工业应用前瞻[J]. 食品与机械, 2006(2): 113-116.
- [7] 郭勇. 酶工程原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005.