

嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶的分离纯化研究

王 武^{1,2}, 付 敏¹, 唐晓明¹, 潘 见^{2,*}

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009

2. 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

摘 要: 本实验对嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶的分离纯化进行了研究。嗜酸乳杆菌的粗酶液经 40%~80% 饱和度的硫酸铵盐析、透析、Sephadex G-100 凝胶过滤层析等步骤进行分离纯化后, 酶的纯化倍数达到 3.10, 比活力为 475.75U/(mg 蛋白质); 纯化后的亚油酸异构酶在 SDS-PAGE 电泳中只呈现一条带, 并测得分子量约为 46.6kDa。

关键词: 嗜酸乳杆菌; 亚油酸异构酶; 分离纯化; SDS-PAGE 电泳

Study on Purification of Lionleic Ismerase from *Lactobacillus acidophilus*

WANG Wu^{1,2}, FU Min¹, TANG Xiao-ming¹, PAN Jian^{2,*}

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei 230009, China)

Abstract: The purification of Lionleic ismerase in *Lactobacillus acidophilus* were studied in this paper. Crude enzyme from *Lactobacillus acidophilus* was purified by ammonium sulfate solution of 40%~80%, dialysis and Sephadex G-100 gel fractionation chromatography, achieving an overall purification of 3.10-fold and a specific activity of 475.45[U/(mg protein)]. The purified enzyme was a single distinct protein band by SDS-PAGE, with an estimated molecular weight of about 46.6 kDa.

Key words *Lactobacillus acidophilus* lionleic ismerase; purification; SDS-PAGE

中图分类号: Q558

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0305-04

共轭亚油酸(简称 CLA)是一系列在 C9, 11 或 C10, 12 位具有双键的亚油酸(linoleic acid 简称 LA)的位置和几何异构体的总称^[1]。研究发现, CLA 具有抑制肿瘤^[2-3]、抗动脉粥样硬化^[4]、抗氧化等生理功能, 在食品医药领域具有诱人的应用前景。目前获取 CLA 的方法主要有化学合成法和生物合成法^[5], 化学合成法产率较高, 但产物往往是多种异构体的混合物, 且含环化副产物, 难以分离, 制约了其在食品医药领域的应用; 生物合成法则是利用亚油酸异构酶将 LA 转化为高活性的 c9, t11-18:2 和(或) t10, c12-18:2 CLA, 应用前景广阔。

亚油酸异构酶(Lionleic ismerase)是微生物细胞在培养液中存在 LA 诱导的前提下, 于菌体内生成的一种胞内酶^[6], 它只作用于具有 cis9, cis12-18:2 二烯结构且羧基游离的脂肪酸, 不同的菌体可产生不同的亚油酸异构酶, 相应地可生成不同的 CLA 异构体, 该酶可以通过细胞形式催化 LA 转化为 CLA 的反应, 也可以通过分离出的膜形式进行反应。本实验以嗜酸乳杆菌为研究对象, 探索其所产生的亚油酸异构酶的分离纯化条件, 为今后利用微生物酶法工业化生产活性 CLA 提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌种及试剂

嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus* l. 1854) 中科院生物所。

共轭亚油酸(99%)、亚油酸(60%) Sigma 公司; K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O、柠檬酸二铵、NaAc、葡萄糖、乳糖、NaCl、正己烷、考马斯亮蓝 G-250、考马斯亮蓝 R-250、聚乙二醇、Sephadex G-100(Amersham Biosciences AB SE-751 Sweden)、磷酸氢二钠、十二烷基硫酸钠、巯基乙醇、丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙稀酰胺、四甲基乙二胺、过硫酸铵、盐酸、Tris、脲、柠檬酸 均为分析纯; 溶菌酶 上海源聚生物科技有限公司; 低分子量标准蛋白 中国科学院上海生物化学研究所; 蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、均为生化试剂; 脱脂奶粉 食品级。

1.1.2 实验设备

DNP-9162型电热恒温培养箱 上海一恒科技有限公

收稿日期: 2007-08-05

*通讯作者

作者简介: 王武(1968-), 男, 副教授, 在职博士研究生, 研究方向为农产品生物化工。

司; 721 分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; UV-1600 紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; JY92-II 超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司; GL-20G 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; BT1-100 恒流泵、HD-21-88 紫外检测器、1.5 × 60cm 层析柱 上海琪特分析仪器有限公司; SBS-100 数控计滴自动部分收集器 上海沪西分析仪器有限公司; DYY-11 型电泳仪、DYCZ-24E 型电泳槽 北京市六一仪器厂; 真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司等。

1.2 培养基

MRS 斜面培养基: 按 MRS 培养基配置后, 加入 15g 琼脂配成 1L 溶液, 在 0.1MPa (表压) 下灭菌 30min; 种子培养基: 用脱脂奶粉配成 12% 的脱脂乳培养基, 0.05~0.07MPa (表压) 下灭菌 10~15min; 产酶培养基^[7]: 用脱脂奶粉配成 12% 的脱脂乳培养基, 添加 0.1% (W/V) 的乳糖、0.1% (W/V) 硫酸铵、0.1% (W/V) NaCl、0.1% (W/V) 亚油酸, 0.05~0.07MPa (表压) 下灭菌 10~15min。

1.3 细胞培养方法

1.3.1 种子培养方法

将嗜酸乳杆菌接到 MRS 斜面培养基上, 37℃ 恒温培养 24h 后, 接入种子培养基三角瓶内, 37℃ 恒温培养 24h, 2℃ 下保藏待用。

1.3.2 产酶培养方法

在产酶培养基中接入 2ml 种子液于 250ml 的三角瓶中, 37℃ 恒温培养 36h, 得到含亚油酸异构酶的培养液。

1.4 蛋白质浓度的测定

采用考马斯亮蓝法。制作吸光度 A_{595nm} 与蛋白质浓度关系的标准曲线, 根据吸光度 A_{595nm} 计算蛋白质浓度。

1.5 共轭亚油酸的检测

采用紫外分光光度法^[8]。制作吸光度 A_{233nm} 与 CLA 浓度关系的标准曲线, 根据吸光度 A_{233nm} 计算 CLA 浓度。

1.6 酶活力的测定

选比色测定法^[9]测定亚油酸异构酶的酶活力。

1h 内生成 1μg CLA 所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力 (U/ml)} = \frac{K \times G}{V \times T}$$

式中, K 为酶液稀释倍数; G 为所生成的共轭亚油酸量 (μg); V 为吸取酶液体积 (ml); T 为反应时间 (h)。

$$\text{酶活力回收率 (\%)} = \frac{\text{每次总活力}}{\text{第一次总活力}} \times 100$$

比活率 = 活力单位数 / mg 蛋白

1.7 亚油酸异构酶的分离和纯化工艺

亚油酸异构酶分离纯化的步骤^[9]:

菌种活化 → 细胞培养 → 细胞收集 → 细胞破碎 → 硫酸铵分段盐析 → 透析 → 聚乙二醇 (PEG) 浓缩 → Sephadex G-100 凝胶过滤层析 → 真空冷冻干燥 → 酶纯度鉴定及分子量测定

1.7.1 菌体细胞培养和收集

将 1ml 种子液, 接入 100ml 产酶培养基中, 在 37℃ 恒温培养 36h 后, 离心 (8000r/min, 20min, 4℃) 收集细胞, 用 0.9% 的生理盐水洗涤两遍, 存放备用。

1.7.2 细胞破碎^[10]

以 1:4 (W/W) 的比例将湿细胞与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 4.0) 混匀, 超声破碎 (超声波处理条件为 400W, 超声 5s, 间歇 10s, 99 次), 向超声处理后的细胞悬液中加入 1% 的溶菌酶, 室温下消化 1.5h, 离心 (8000r/min, 20min, 4℃) 后取上清液, 即得亚油酸异构酶的粗酶液, 测定其蛋白质含量和酶活力。

1.7.3 饱和硫酸铵分段盐析^[11]

首先确定分段盐析的最佳盐析范围。取 100ml 粗酶液, 在冰水浴条件下, 5min 内缓慢加入经研磨干燥的硫酸铵粉末至设定饱和度, 缓慢搅拌 30min 后于 4℃ 下静置过夜。离心 (8000r/min, 30min, 4℃) 收集沉淀, 移出上清液并向其中继续加入硫酸铵至下一设定的饱和度, 静置、离心收集沉淀, 条件同上。选取的硫酸铵饱和度范围为 30%~90%, 每隔 10% 为一个测试点, 将每次所得沉淀用 10ml pH 4.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液溶解, 然后测定各饱和度下所得沉淀的蛋白质含量和酶活力, 以确定最佳硫酸铵盐析范围。

最佳盐析范围确定后, 首先向粗酶液中加入饱和度为 40% 的硫酸铵, 4℃ 静置过夜后, 离心 (8000r/min, 30min, 4℃), 移出上清液 (粗酶液) 并计量体积; 在冰水浴条件下, 再向上清液加入饱和度为 80% 的硫酸铵, 4℃ 静置过夜, 离心 (10000r/min, 20min, 4℃) 收集沉淀。

1.7.4 透析与浓缩

将经硫酸铵分段盐析所得的酶沉淀用 2~3 倍体积的 pH 4.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液悬浮, 然后装入经过预处理的透析袋 (D16mm, 透析分子量 8000Da, 剪成 15~20cm 长的片断), 扎紧后浸入大体积 pH 4.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中, 4℃ 下磁力搅拌。开始每隔 4h 左右更换一次缓冲液, 几次后可适当延长换液的间隔时间。用 1mol/L BaCl₂ 溶液检查脱盐情况, 至无沉淀产生时即认为透析达到平衡。

将上述装有酶液的透析袋直接埋于装有聚乙二醇的烧杯中, 放入冰箱内观察脱水情况, 直至酶液样品浓缩到需要的体积。

1.7.5 Sephadex G-100凝胶过滤层析

选择Sephadex G-100凝胶分离纯化亚油酸异构酶。

加样2ml浓缩酶液,洗脱流速0.3ml/min,自动收集经过紫外检测仪检测的洗脱液,每管2ml。纪录每管吸光度 A_{280nm} ,然后以洗脱液的体积(管号 $\times 2.0$)为横坐标,以洗脱液的吸光度 A_{280nm} 为纵坐标,绘制洗脱曲线;对于吸光度值较大的洗脱液同时测定酶活力,收集酶活力较大的几管洗脱液,用聚乙二醇浓缩后测定其蛋白质含量和酶活力,真空冷冻干燥后备用。

1.8 亚油酸异构酶的纯度检测及分子量测定

采用不连续SDS-聚丙烯酰胺(PAGE)检测亚油酸异构酶的纯度和测定分子量。电泳条件为恒电流式(30mA),分离胶浓度为12%,浓缩胶浓度为5%;用考马斯亮蓝R-250染色显示蛋白带,根据真空冷冻干燥后的酶样品和标准蛋白的SDS-PAGE电泳图,测定样品和标准蛋白的相对迁移率 R_f ,以标准蛋白的 R_f 为横坐标,相应相对分子量的对数值为纵坐标作标准曲线,通过计算样品的 R_f 求得分子量。

2 结果与分析

2.1 饱和硫酸铵分段盐析范围的确定

饱和硫酸铵分段盐析中沉淀中的总蛋白质含量和酶活力如表1所示。

表1 硫酸铵分级盐析结果
Table 1 Result of different ammonium sulfate saturated concentration salt-out

组别	$(NH_4)_2SO_4$	蛋白质		亚油酸异构酶		纯化倍数
		含量(mg/ml)	比例(%)	活性(U/ml)	比例(%)	
1	0~30%	0.8111	31.26	12.32	7.35	0.23
2	30%~40%	0.6857	26.42	14.47	8.63	0.32
3	40%~50%	0.3670	14.14	16.79	10.02	0.70
4	50%~60%	0.3054	11.77	16.62	9.92	0.83
5	60%~70%	0.2975	11.46	63.69	38.01	3.28
6	70%~80%	0.0880	3.39	33.03	19.71	5.76
7	80%~90%	0.0402	1.55	10.66	6.36	4.10

从表1可以看出,虽然1,2两组中的蛋白质的得率较高,但是亚油酸异构酶的得率较低且纯化倍数小于1,说明大部分亚油酸异构酶还在上清液,沉淀中只有很少的一部分,需进一步盐析;而5,6两组虽然蛋白质的得率较低,但是亚油酸异构酶的得率较高而且纯化倍数大于1;第7组虽然纯化倍数较大,但得率过低。综合考虑酶的得率和纯度,宜先选用40%饱和度的硫酸铵除去大部分杂质蛋白,再用80%饱和度的硫酸铵沉淀上清液部分,离心收集沉淀物。因此40%~80%为较理想的盐析范围。

2.2 Sephadex G-100凝胶过滤层析

经过硫酸铵分段盐析、透析袋透析和PEG聚乙二醇浓缩后的亚油酸异构酶液采用Sephadex G-100凝胶柱进一步纯化。亚油酸异构酶的Sephadex G-100凝胶柱层析洗脱曲线如图1所示。

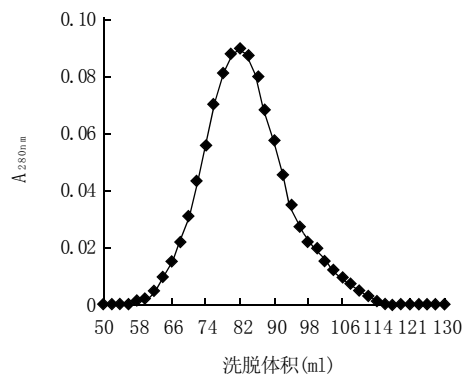


图1 Sephadex G-100凝胶过滤层析洗脱曲线
Fig.1 Wash curve of Sephadex G-100 gel fractionation chromatography

从图1可以看出,经过Sephadex G-100凝胶柱层析的洗脱曲线中只出现了1个峰值,将峰值处的洗脱液经透析适当浓缩后,测定酶活力,结果表明峰值处的洗脱液具有亚油酸异构酶活力,因此该洗脱峰即为亚油酸异构酶的洗脱峰。收集酶活力较大的从第39~43管的洗脱液共计10ml。经透析适当浓缩后,测定蛋白质含量和酶活力,以评价层析效果。洗脱液冷冻干燥后作为SDS-PAGE电泳的样品。

2.3 分离纯化工艺对蛋白质总量及酶活力的影响

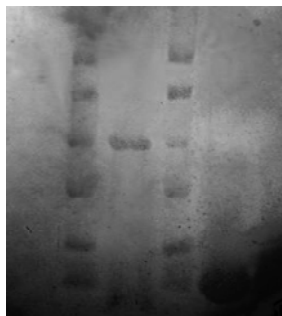
酶液经过多步分离纯化后,蛋白总量及酶活力发生了很大变化。粗酶液经硫酸铵分段盐析、透析、PEG聚乙二醇浓缩和Sephadex G-100凝胶过滤层析分离纯化,得到电泳纯的亚油酸异构酶。分离纯化过程中蛋白质、总酶活力、比酶活力、酶活力回收率及纯化倍数见表2。分离纯化过程的纯化倍数达3.10,酶活力回收率为1.25%。由于亚油酸异构酶是LA诱导下,嗜酸乳杆菌生长过程中的次级代谢产物,所以回收率相对粗酶液低。

表2 亚油酸异构酶分离纯化的结果
Table 2 Result of purification of Lionleic ismerase

纯化步骤	酶活力 U	蛋白质 含量(ml)	比活力 (U/mg)	纯化 倍数	酶活力回 收率(%)
粗酶液	8507.52	55.402	153.56	1.00	100
40%饱和度硫酸铵	5610.24	24.475	229.22	1.49	65.94
80%饱和度硫酸铵	3379.95	11.655	290.00	1.88	39.73
透析袋透析	3211.35	10.428	307.95	2.01	37.75
PEG浓缩	806.25	2.178	370.18	2.41	9.50
Sephadex G-100层析	106.5	0.224	475.45	3.10	1.25

2.4 亚油酸异构酶的纯度检测及分子量测定

将经真空冷冻干燥后的层析洗脱液作为不连续 SDS-PAGE 电泳的样品,以低分子量标准蛋白为标准,电泳完成后用考马斯亮蓝 R-250 染色显现蛋白带。得亚油酸异构酶与标准蛋白质的 SDS-PAGE 电泳的结果如图 2 所示。



标准蛋白带自(-)极至(+)极分别为:兔磷酸化酶 B 97.4kDa,牛血清白蛋白 66.2kDa,兔肌动蛋白 43.0kDa,牛碳酸酐酶 31.0kDa,胰蛋白酶抑制剂 20.1kDa,鸡蛋清溶菌酶 14.4kDa。

图2 亚油酸异构酶的 SDS-PAGE 图
Fig.2 SDS-PAGE chart of Linoleic isomerase

从图 2 可以看出,亚油酸异构酶的 SDS-PAGE 的电泳图中只有单一的条带且条带清晰。说明分离纯化后的亚油酸异构酶仅有单一的亚基,酶液已经达到了电泳纯。SDS-PAGE 电泳中亚油酸异构酶的相对迁移率为 $R_f=0.401$,代入标准曲线方程 $\lg Mr = -0.1672R_f + 2.1509$ ($R^2=0.9987$),可得亚油酸异构酶亚基的相对分子质量为 46.6kDa。

3 结 论

3.1 饱和硫酸铵分段盐析实验结果表明,嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶的最佳盐析范围为 40%~80%,分段盐析后酶活回收率为 39.73%,纯化倍数为 1.88。

3.2 分离纯化过程对蛋白总量及酶活力影响较大。嗜

酸乳杆菌亚油酸异构酶粗酶液经过 40%~80% 饱和度的硫酸铵盐析、透析袋透析、Sephadex G-100 凝胶过滤层析等分离纯化操作后,酶活力回收率为 1.25%,纯化倍数为 3.10。

3.3 在不连续的 SDS-PAGE 电泳中,亚油酸异构酶仅呈现出单一的蛋白质条带,说明分离纯化后的亚油酸异构酶是由单一亚基组成的蛋白质,其分子量约为 46.6kDa,也表明经过分离纯化后的酶液已经达到了电泳纯。

参考文献:

- [1] 王月因,曹健,曾实,等.共轭亚油酸生物合成的研究[J].食品研究与开发,2006,27(4):4-8.
- [2] MAJUMDER B, WAHLE K W J, MOIR S, et al. Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells[J]. FASEB, 2002, 16: 1447-1449.
- [3] HAN J C, WOO K K, EUN J K, et al. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284: G996-G1005.
- [4] 范亚苇,邓泽元,刘蓉,等.共轭亚油酸对动脉粥样硬化老龄大鼠血脂和血浆脂肪酸的影响[J].营养学报,2006,28(6):474-474.
- [5] 曹莹,杨林,陈振宇,等.共轭亚油酸的合成、分析与氧化稳定性[J].化学通报,2004(4):257-265.
- [6] PAIZA M W, YANG Xiao-yun. Method of producing conjugated fatty acids[P]. United States patent: 5856149, 1999-01.
- [7] 张浩.亚油酸异构酶及其性质的研究[D].郑州:河南工业大学,2005.
- [8] 薛秀恒,王志耕,王菊花,等.牛奶中共轭亚油酸含量的紫外分光光度测定方法[J].食品工业科技,2005(7):176-178.
- [9] 苗士达,张中义,刘萍,等.植物乳杆菌亚油酸异构酶的分离纯化及性质研究[J].食品与发酵工业,2005,31(3):12-15.
- [10] PENG S S, MING-De, GRUNG A D, et al. Purification and characterization of a membrane-bound linoleic acid isomerase from clostridium sporogenes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40: 831-839.
- [11] 周跃钢,张瑞宇,金学军,等.豇豆根瘤亚细胞中的ASAL的分段盐析[J].西南农业学报:自然科学报,2003,25(4):287-289.



信 息

全新酵母基因组图谱出炉

来自美国斯坦福大学医学院遗传学系、斯坦福基因组技术研究中心(Stanford Genome Technology Center)、加拿大多伦多大学Terrence Donnelly 细胞与生物分子研究中心的研究人员设计出了一种新的方法对酵母中 70000 个核小体(Nucleosomes)成功进行了描绘,获得了一张全新的酵母基因组图谱,这有助于我们了解和预测细胞的核小体状态,以及研究细胞遗传物质活动过程中的详细细节。这一研究成果公布在《自然—遗传学》(Nature Genetics)杂志上。

领导这一研究的是多伦多大学分子遗传学系、医学研究系的副教授 Corey Nislow。在这篇文章中,Nislow 领导的研究小组获得了一张完整的、三维的酵母基因组图谱。研究人员将这些信息输入电脑,建立了一个软件程序,帮助预测核小体会出现在细胞关键步骤中的哪儿——核小体在 DNA 翻译成蛋白之前会缠绕在 DNA 上,是一个细胞状态关键的指示核调控元件。在获得这一预测程序后,研究人员进一步证明了这一程序在预测核小体状态,以及细胞状态方面的重要作用。

Nislow 表示,“当失去调控的时候,细胞就会产生错误的蛋白,或者进行不正确的分裂,这些在癌症之类的疾病细胞中都会出现”,“了解核小体出现在哪儿,是分辨细胞正在进行什么程序,将要进行什么活动的第一步,因此这个最初研究对于某些疾病的早期诊断意义重大。”

总而言之,科学家们可以通过了解核小体的状态判断哪些基因被激活,翻译成蛋白,而且这些信息可以作为疾病诊断的重要的第一步。