

N-氨甲酰基-D-氨基酸酰胺水解酶的快速纯化及性质*

袁静明 石亚伟 杨秀清

连惠勇 齐延红

(山西大学生物工程中心 太原 030006) (山西省生物研究所 太原 030006)

摘 要:通过硫酸铵分级沉淀、疏水层析及阴离子交换层析等三步,有效地从一株 NO.2262 中纯化了 N-氨甲酰基-D-氨基酸酰胺水解酶。结果表明,酶活性回收约 20%,纯化了 8.4 倍。天然 PAGE 与 SDS-PAGE 分析表明,该酶分子为同源四聚体,单体分子量约为 35kD。酶催化反应的最适 pH 为 7.7~8.0,最适温度为 45℃。以 N-氨甲酰-DL-丙氨酸为底物时, $K_m = 1.3 \times 10^{-3}$ mol/L, $V_{max} = 0.33$ mol/min。二价金属离子 Ni^{2+} 有激活作用, Zn^{2+} 有明显的抑制作用,而 Co^{2+} 对酶活无影响。该酶 N-末端 8 个氨基酸残基依次为 TRQKILAF。

关键词: 菌株 NO.2262, N-氨甲酰基-D-氨基酸酰胺水解酶,纯化,性质

中图分类号: Q559 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2002) 01-0088-05

N-氨甲酰基-氨基酸酰胺水解酶 (EC 3.5.1.6) 能高度专一性地脱氨甲酰化,形成游离氨基酸,根据被转化底物的构型可分为 D-和 L-型两种^[1]。微生物产生的 N-氨甲酰基-D-氨基酸酰胺水解酶 (N-Carbamyl-D-amino acid amidohydrolase, D-Carbamoylase, 简称 DCase) 生物转化生产 D-型氨基酸是医药和食品行业获得 D-氨基酸的主要途径。因而研究 D-氨基酸的生物转化具有重要的实用意义^[2]。

半合成抗生素类药物如阿莫西林 (Amoxicillin) 和欧意 (Cefadriol) 都是由 D-对羟基苯甘氨酸 (D-HPG) 和 6-氨基青霉素烷酸 (6-APA) 或 7-氨基头孢烷酸 (7ACA) 两部分组成,其中 D-HPG 是由微生物产生的 D-海因酶和 DCase 两酶酶促合成^[3]。我们曾报道过同一菌株 D-海因酶的纯化及性质研究^[4]。本文就 DCase 的纯化及性质作进一步报道。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养^[4]

1.2 试剂与设备

N-氨甲酰基-DL-丙氨酸, 茈萘蓝 (Hydrindantin) 购自 Sigma 公司, 蛋白质分子量标准为 NEB 产品, 载体 Phenyl-Sepharose 和 Hitrap Q 预装柱为 Pharmacia 产品, 其他试剂均为国产分析纯。柱层析在 AKTA purifier 或 LKB 层析系统进行操作。

1.3 酶活性测定^[5]

酶反应体系 0.5mL, 包括 20mmol/L PBS pH8.0, 0.3mL, 10mmol/L N-氨甲酰基-DL-丙氨酸 0.1mL 和酶液 0.1mL, 于 35℃ 保温 30min, 然后迅速取 0.1mL 酶反应液与 0.1mL 2mol/L

* 山西省重点行业科技发展项目 (983225)

作者简介: 袁静明 (1935-), 男, 上海市人, 教授, 博士生导师, 61 年毕业于复旦大学, 主要从事蛋白质工程研究。参加本工作的还有山西省生物研究所齐长兴, 丁玉华

收稿日期: 2001-03-02, 修回日期: 2001-06-01

醋酸钠缓冲液 pH5.5 混合以终止酶反应,于 60℃ 保温 5min,再加入 0.1mL 茆三酮混合液 (174mg 茆三酮,174mg 茆氮蓝和 15mL 乙二醇甲醚)60℃ 继续保温 20min,再加入 1mL 60% 的乙醇,彻底混合后,读取 570nm 光吸收。

酶活性单位定义:在上述测定条件下,每分钟产生 1 mol 丙氨酸的酶量为 1U。

1.4 蛋白质浓度测定

按 Bradford 法^[6],以牛血清蛋白为标准。

1.5 电泳分析

Native-PAGE 及 SDS-PAGE 按文献进行^[4]。

2 结果

2.1 酶的分离纯化

2.1.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分部:将 0.5L 发酵液所得的湿菌体(约 15g)悬浮于约 30mL 含 2mmol/L DTT, 1.5mmol/L PMSF, 2mmol/L EDTA 的 20mmol/L PBS, pH8.0 中,于冰浴超声破碎细胞。离心后的上清液即为初始酶液。加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 35% 饱和度,DCase 活性主要在沉淀部分。用 25mL 上述 PBS 溶解沉淀,并对相同缓冲液彻底透析 24h,离心至清,供下一步骤纯化。

2.1.2 疏水层析:上述透析过的酶上清液用 NaCl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 调整其盐浓度分别达 1mol/L 和 0.3mol/L,然后通过用 1mol/L NaCl 和 0.3mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 5mmol/L PBS, pH8.0 预平衡的 Phenyl-Sepharose 柱,当样品全部穿透后,分别用 0.5mol/L NaCl,0.1mol/L NaCl,5mmol/L PBS, pH8.0 和水进行分级梯度洗脱,结果如图 1,DCase 活性主要存在于峰 4*。

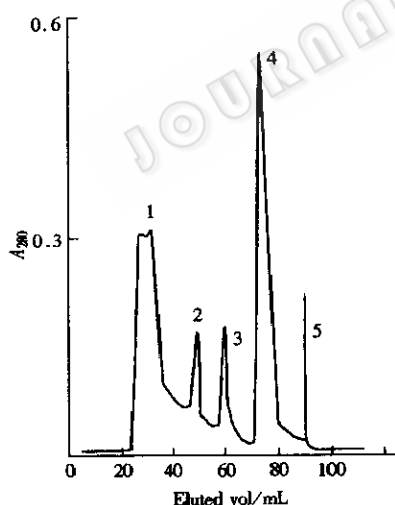


图 1 DCase 的疏水层析图谱

Fig.1 A profile of DCase hydrophobic chromatography

1. Flow through; 2. 0.5mol/L NaCl in the equilibrium buffer;
3. 1.0mol/L NaCl in the same Buffer; 4. 5mmol/L PBS only;
5. Water only.

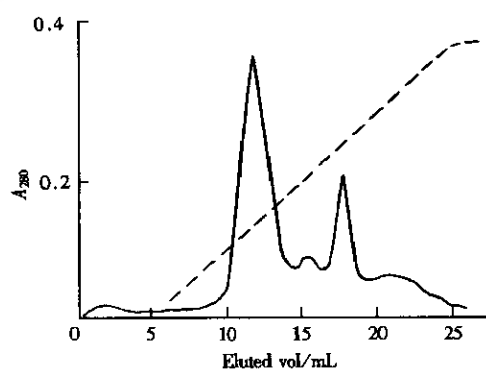


图 2 DCase 在 Hitrap Q(1ml) 柱的分离图谱

Fig.2 The profile of DCase on prepacked Hitrap Q column (1ml) using AKTA purifier

2.1.3 离子交换层析:将上述峰 * 4 经 PM10 膜超滤浓缩后,经用 20mmol/L PBS, pH8.0 预平衡的 Hitrap Q 预装柱(1mL)于 AKTA purifier 上进行离子交换层析。洗涤除去未交换的蛋白后用 0 ~ 0.5mol/L NaCl

进行连续梯度洗脱。结果如图 2,活性部分主要在 0.15mol/L ~ 0.2mol/L NaCl 洗脱部分。

2.1.4 纯化效果:经上述三步,即可获得纯 DCase,结果如表 1。

表 1 DCase 纯化总表(15g 菌体)

Table 1 A summary of DCase purification (from 15g pellets)

Steps	Total proteins/mg	Protein recovery/%	Total activity/U	Activity recovery/%	Specific activity/(U/mg)	Purification factor
Crude extract	1162.00	100.00	116.20	100.00	0.10	1.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ ppt.	371.84	32.00	108.07	93.00	0.29	2.90
Phenyl-Sepharose	112.00	9.60	48.80	42.00	0.44	4.40
Hitrap Q (1mL)	25.00	2.15	20.92	18.00	0.84	8.40

2.1.5 纯化各阶段产物的电泳分析:上述各部分经 12% SDS-PAGE 分析,如图 3。经三步纯化后就得到约 35kD 的纯 DCase。因样品点样量不一致,因此单从电泳图谱很难正确判断上述三步的效果。从表 1 可知蛋白回收约为 2%,活性回收近于 21%,总提纯了约 8 倍。

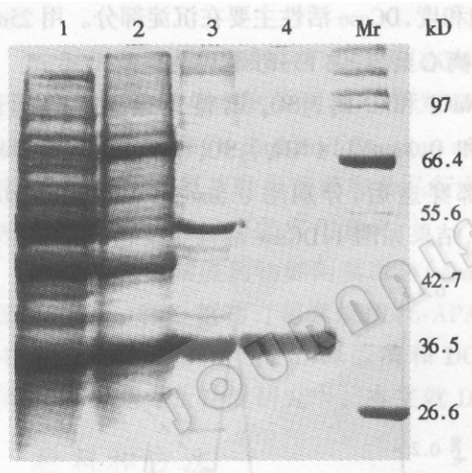


图 3 各步纯化产物的电泳图谱
(12% SDS-PAGE)

Fig. 3 The electrophoretic patterns of proteins in the different steps of purification on 12% SDS-PAGE

1. The supernatant from sonication and centrifugation; 2. The precipitate of 35% Sat. (NH₄)₂SO₄; 3. Peak # 4 from Fig. 1; 4. Peak # 2 from Fig. 2.

2.2 酶的性质

2.2.1 基本动力学常数 K_m 及 V_{max} :以不同浓度 N-氨甲酰-DL-丙氨酸为底物,测定酶的反应速度,再用双倒数作图或 Hofstee 作图。所得的 $K_m = 1.3 \times 10^{-3}$ mol/L, $V_{max} = 0.33$ umol/min, 这一数值与文献报道基本一致^[7]。从 K_m 值比 D-海因酶低一个数量级看,该酶与底物结合更为紧密,是转化过程中的限速阶段。

2.2.2 最适 pH 与最适温度:在标准反应条件下,于 20mmol/L 不同缓冲物质的 pH 条件下测定酶活性,所用缓冲液为 pH5.5 ~ 6.0 为 HAc - NaAc; pH6.0 ~ 8.0 为 PBS; pH8.0 ~ 9.5 为 Tris - HCl; pH9.5 ~ 11.0 为 Na₂CO₃ - NaHCO₃。结果表明其最适 pH 为 7.7 ~ 8.0。在不同温度下测定酶活性,该酶最适温度为 45℃。从 25℃到 45℃曲线缓慢上升,但超过 45℃,活性急剧下降,55℃时活性只有 50%。表明其热稳定性较差。

2.2.3 天然酶分子的状态:按文献报道^[8],

DCase 常以同型聚合体形式存在。SDS-PAGE 分析表明本文纯化的 DCase 单体分子量约为 35kD。而经天然 PAGE 分析(图 4),DCase 同 BSA 二聚体相当,约 135kD。表明它可能是四聚体。Superose12 凝胶过滤分析也表明 DCase 接近于四聚体(数据未列出)。

2.2.4 N-末端氨基酸序列:经由北京大学生命科学学院代测 DCase 纯酶 N-末端 8 个氨基酸残基分别为 TRQKILAF。其同源性与农杆菌更类似。

表 2 DCase 的 N-末端氨基酸同源性
Table 2 The homology of N-terminal amino acid
sequence of DCase in some strains

Species	a.a residues
<i>Pseudomonas</i> sp. ^[10]	T R I V N A A A
<i>Comamonas</i> sp. ^[7]	S R I V N Y A A
<i>Blastobacteria</i> sp. ^[7]	A R K L N L A V
<i>Agrobacteria</i> sp. ^[9]	T R Q M I L A V
This strain	T R Q K I L A F

2.2.5 某些二价金属离子对酶活性的影响:二价金属离子,特别是一些过渡态金属离子对酶活性影响十分不同。在 1 mmol/L 浓度时,同周期的 Co^{2+} 不影响酶活, Ni^{2+} 能激活该酶,而 Zn^{2+} 却具有明显的抑制作用。为了进一步证实 Zn^{2+} 抑制作用,经 Zn^{2+} 浓度梯度实验表明,即使在 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L Zn}^{2+}$ 时,仍表现强烈抑制(数据未列出)。这一现象需要进一步研究。

3 讨论

随着蛋白质纯化技术的不断发展,从菌株中分离纯化一个目的蛋白或酶已非难事,但毕竟要经历多步操作才能获得满意的结果。除了应用具有对应配体的特异性载体进行亲和纯化外,一般均需 4~5 步以上操作,才能达到纯化目的^[11]。然而,本实验中只用三步,就有效地从菌株中纯化了 DCase,达到 SDS-PAGE 纯。诚然,这一结果是经多种载体多次实验后的综合效应。在常压下曾用 Q-Sepharose ff, SP-Sepharose ff; DEAE-Cellulose D52, Sephacryl S-200 等均未获得满意结果。然而经疏水层析后,再经 Hitrap Q HR 柱就得到了纯 DCase。这一结果为后续研究奠定了基础。

二价金属离子对酶活性的影响比较难以理解。同一周期的 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 却有截然不同的结果,为了验证这一结果,曾用同一离子的浓度梯度对酶活性影响和不同离子浓度对显色系统的影响,均排除了实验误差的可能性。因此,这一现象将有待进一步验证。

DCase 的 N-末端氨基酸残基序列表明,该菌株同农杆菌具有明显的相似性^[9]。比较前文^[4]报道的 D-海因酶的 N-末端氨基酸残基序列,似乎该菌株应定名为农杆菌而不是目前暂定的假单胞杆菌,相信随着两个酶的基因全序列的完成,为最终该菌株的定名获得更为可信的答案。

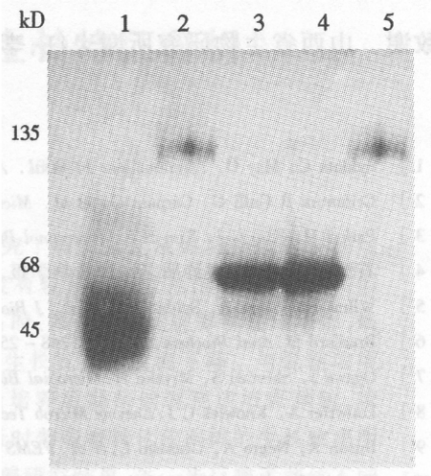


图 4 DCase 的天然胶电泳图谱(10% Native-PAGE)
Fig.4 The electrophoretic patterns of DCase on 10% Native-PAGE
1. Ovalbumin(45kD); 2, 5. Pure DCase from Fig. 2; 3, 4. BSA(67kD).

表 3 某些二价金属离子对酶活性影响
Table 3 The effect of some bivalent metal ions on DCase activity

Ions*	mmol/L	Relative activity/%
-	-	100
Mg^{2+}	1	90
Mn^{2+}	1	11
Ni^{2+}	1	150
Co^{2+}	1	100
Zn^{2+}	1	0

* All supplied as dichloride except Zn^{2+} as sulphate

致谢 山西省生物研究所谢红,李晋川两位所长给予极大支持与关心,在此深表谢意。

参 考 文 献

- [1] Syltatk C, May O, Altenbuchner J, et al. *Applied Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**:293 ~ 309.
- [2] Grifantini R, Galli C, Carpani G, et al. *Microbiology*, 1998, **144**:947 ~ 954.
- [3] Park J H, Kim G J, Kim H S. *Biotechnol Prog*, 2000, **16**:564 ~ 570.
- [4] 石亚伟,李汉卿,袁静明,等. *微生物学报*, 2001, **41**(5):605 ~ 610.
- [5] Wilms B, Wiese A, Syltatk C, et al. *J Biotechnol*, 1999, **68**:101 ~ 113.
- [6] Bradford M. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248 ~ 254.
- [7] Ogawa J, Shimizu S, Miyake H. *Microbial Biotechnol*, 1995, **43**:1039 ~ 1043.
- [8] Louwrier A, Knowles C J. *Enzyme Microb Technol*, 1996, **19**:562 ~ 570.
- [9] Buson A, Negro A, Grasssto L, et al. *FEMS Microbial Lett*, 1996, **145**:55 ~ 62.
- [10] Lkenaka Y, Nanba H, Yamada T. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, **62**:882 ~ 886.
- [11] Lshikaw T, Mukohara Y, Wafabe K. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, **60**:612 ~ 615.

Purification and Some Properties of D-Carbamoylase

Yuan Jingming Shi Yawei Yang Xiuqing

(Biotechnology Center of Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Lian Huiyong Qi Yanhong

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan 030006, China)

Abstract: A D-Carbamoylase produced by a strain NO. 2262 was purified to electrophoretic homogeneity with the recovery of 20 % activity and the purification factor of 8 fold by three steps including $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, hydrophobic column and pre-packed Hitrap Q HR. It is indicated from the results of nativ-PAGE and SDS-PAGE analysis that the enzyme could be a homogeneous tetramer consisting of four 35kD subunits. In addition, its optimal pH and optimal temperature are 8.0 and 45°C respectively. The basic kinetic parameters of the enzyme are $K_m = 1.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ and $V_{\max} = 0.33 \mu\text{mol/min}$ with N-carbamyl-DL-Alanine as the substrate. The effect of bivalent metal ions on the enzyme was showed that Ni^{2+} could be as an activator, Zn^{2+} as a powerful inhibitor, while Co^{2+} had no any influence at all. Its N-terminal sequence is TRQKILAF in turn.

Key words: Strain No.2262, D-Carbamoylase, Purification, Properties