

重组大肠杆菌热稳定性过氧化氢酶的纯化及性质研究

王凡强 王正祥 邵蔚蓝 刘吉泉 徐成勇 诸葛健*

(江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘 要 将产热稳定性过氧化氢酶的重组大肠杆菌培养后菌体破碎得到的粗酶液经热处理、硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析、HiPrep® 16/10 Phenyl 疏水作用层析、Superdex200 HR 10/30 凝胶层析提纯后得到电泳纯的酶,比酶活达到 15629U/mg。此酶的最适温度为 70℃,最适 pH7.0,在 60℃保温 60min 酶活力基本不变,在 pH3~8 的范围内比较稳定。此酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 7.75mmol/L 和 27.8mmol·min⁻¹·mg⁻¹。1mmol/L 的 Zn²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺ 可使该酶完全失活,KCN、NaN₃、Na₂S₂O₄、巯基乙醇对酶活力有抑制作用,50mmol/L 的 EDTA 不影响酶活性。

关键词: 重组大肠杆菌,过氧化氢酶,纯化,性质

中图分类号:Q55 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)03-0348-06

过氧化氢酶(hydrogen peroxide :hydrogen peroxide oxidoreductase EC 1.11.1.6)催化 H₂O₂ 分解为 H₂O 和 O₂ 的反应,几乎存在于所有好氧生活的生物体内,具有清除自由基、保护细胞免受 O₂⁻ 损害等保护生物机体的功能。过氧化氢酶广泛用于生物、医药、临床和食品中的某些分析测定,在食品和乳制品工业、纺织工业、制浆和造纸工业、医疗器械的消毒、葡萄糖酸的生产等方面也有越来越多的应用^[1-2]。商品化的过氧化氢酶主要来源于牛肝、微球菌和黑曲霉,最近 Novozymes 公司推出了遗传修饰生物(GMO)生产的过氧化氢酶商品,用于纺织品的漂白工艺中。

酶的热稳定性及贮存稳定性是它能否大规模生产从而商品化的关键。从 1986 年开始,国内外都开始进行热稳定性的过氧化氢酶的筛选工作,发现了几种嗜热菌产生的过氧化氢酶^[1,3,4,5]。我们将嗜热脂肪芽孢杆菌产过氧化氢酶的基因 *perA* 与表达载体 pKK223-3 构建重组质粒,转化 *E. coli* 过氧化氢酶双突变株 UM2,获得重组大肠杆菌 UM2-1,能够高效表达过氧化氢酶,在纺织工业和制浆造纸工业有潜在的应用价值。本文研究了该菌产生的过氧化氢酶的纯化及性质。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

Vibra Cell™ 超声波细胞破碎仪,Beckman 高速冷冻离心机,岛津 UV-120-2 分光光度计; Pharmacia AKTA explorer 100 层析仪;UVP 凝胶图像分析仪;DEAE-Sephadex A-50, HiPrep®

* 通讯作者

作者简介:王凡强(1971-)男,山东五莲人,江南大学生物工程学院 98 级博士生,主要从事微生物学及分子生物学研究。

收稿日期 2001-06-07,修回日期 2001-07-20

16/10 Phenyl, Superdex 200 HR 10/30 为 Pharmacia 产品; IPTG, 牛血清白蛋白, 低分子量标准蛋白(分子量范围 14400 ~ 94700) 从华美公司购买, 胰蛋白酶, 酵母提取物为 Oxoid 公司产品。其余试剂为国产分析纯。

1.2 菌种及培养方法

重组大肠杆菌 UM2-1 由本室构建。培养方法如下: 从 -70°C 超低温冰箱保存的菌种挑取一环重组大肠杆菌接入盛有 50mL LB 培养基(含氨苄青霉素 $100\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 250mL 三角瓶中, 37°C 200r/min 培养 12 ~ 16h, 然后以 1% 接种量转接到含有 100mL LB 培养基的 500mL 三角瓶中, 培养至 OD_{600} 在 0.4 ~ 0.6, 加入 IPTG 至终浓度 $0.75\text{mmol}/\text{L}$, 诱导培养 3h。

1.3 过氧化氢酶活力测定^[5,6]

在 70°C 用分光光度法测定, 以加入 0.1mL 酶液的 2.9mL pH7.0 的 $50\text{mmol}/\text{L}$ KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液作为对照, 测定加入 0.1mL 酶液后含有 H_2O_2 的 2.9mL pH7.0 的 $50\text{mmol}/\text{L}$ KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液(H_2O 终浓度为 $10\text{mmol}/\text{L}$) 在 240nm 处光密度的减少值, 取 $\epsilon_{240} = 43.6\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ 计算酶活力。酶活力定义为每分钟分解 $1\mu\text{mol}$ H_2O_2 所需酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.4 蛋白含量测定^[7]

按 Lowry 等人的方法进行, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.5 电泳分析^[8]

酶的纯度用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行鉴定, 分离胶浓度 8%, 浓缩胶浓度 4%, 考马斯亮蓝 R-250 染色。

2 结果和分析

2.1 重组热稳定性过氧化氢酶的分离与纯化

2.1.1 粗酶液制备 将重组菌发酵液用 $5000 \times g$ 离心 10min, 收集菌体, 重悬于 $0.02\text{mol}/\text{L}$ pH7.0 的磷酸钠-磷酸钾缓冲液中, 用超声波破碎仪 20HZ 破碎 10min, 然后于 $15000 \times g$ 离心 10min 去除菌体碎片即得粗酶液。

2.1.2 热处理 在粗酶液中加入 DNase I 使终浓度达到 $10\text{U}/\text{mL}$, 37°C 保温 30min, 然后在 65°C 保温 10min, $15000 \times g$ 离心 15min 收集上清液。这步处理可去除 DNA 和部分杂蛋白。

2.1.3 硫酸铵分级沉淀 向经热处理的粗酶液中加入 10% 饱和度的硫酸铵, 离心去除沉淀。在上清液中继续加入硫酸铵至 45% 饱和度, 离心收集沉淀。

2.1.4 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析 将沉淀物用 pH7.0 的 $0.02\text{mol}/\text{L}$ 磷酸钠-磷酸钾缓冲液溶解, 室温下按酶与缓冲液 1:100 体积比透析脱盐, 其间换缓冲液数次, 脱盐后酶液用 PEG-8000 浓缩。然后将酶液加样到 DEAE-Sephadex A-50 柱 ($35\text{cm} \times 40\text{cm}$) 上, 用含 NaCl 的 pH7.0 的 $0.02\text{mol}/\text{L}$ 磷酸钠-磷酸钾缓冲液洗脱, NaCl 的浓度梯度为 $0 \sim 0.8\text{mol}/\text{L}$, 流速 $1\text{mL}/\text{min}$ 。收集具酶活的组分并脱盐浓缩。酶液经本步处理可去除大部分杂蛋白。

2.1.5 HiPrep® 16/10 Phenyl 疏水作用层析 将上步获得酶液与 $1\text{mol}/\text{L}$ 硫酸铵的 pH7.0 的 $0.02\text{mol}/\text{L}$ 磷酸钠-磷酸钾缓冲液 1:1 体积比混合, 加样到 HiPrep® 16/10 Phenyl 柱上, 用含有硫酸铵的 pH7.0 的 $0.02\text{mol}/\text{L}$ 磷酸钠-磷酸钾缓冲液洗脱, 硫酸铵的浓度梯度为 $0.5 \sim 1.0\text{mol}/\text{L}$ 。

0mol/L, 流速 1mL/min。收集具有活性的组分并浓缩。结果发现重组过氧化氢酶疏水性很强, 在不含有硫酸铵的缓冲液中才能洗脱下来, 可去除绝大部分杂蛋白。

2.1.6 Superdex200 HR 10/30 凝胶层析: 将上步获得酶液加样到 Superdex200 HR 10/30 柱上, 用 pH7.0 的 0.02mol/L 磷酸钠-磷酸钾缓冲液洗脱, 流速 0.4mL/min, 收集具有活性的组分。将纯化各步获得酶液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 各步加样量分别为 180 μ g、130 μ g、50 μ g、5 μ g、3 μ g、0.3 μ g。结果发现经过上述步骤的分离纯化, 样品已达到电泳纯(图 1) 亚基分子量约 86000, 与文献报道的天然酶分子量一致^[3]。纯化过程中的酶活力及蛋白含量变化见表 1。

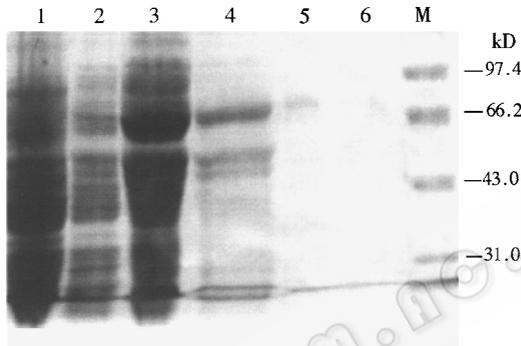


图 1 纯化过程中 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig.1 SDS-PAGE patterns of samples from different steps of purification
M. Proteins marker; 1~6. Correspond to steps 1~6 in table 1.

表 1 重组大肠杆菌热稳定性过氧化氢酶的纯化

Table 1 Purification of thermostable catalase from recombinant *E. coli* UM2-1

Step	Total protein /mg	Total activity/U	Specific activity (U/mg)	Activity recovery/%	Purification fold
Crude extract	5339.1	445871.6	83.5	100.0	1.0
Heat treatment	3651.3	439629.3	120.4	98.6	1.4
Ammonium sulfate	398.9	388073.3	972.9	87.0	11.7
DEAE-Sephadex A-50	21.0	206422.0	9829.6	46.3	117.7
Phenyl-agarose	7.9	80091.8	10138.2	18.0	121.4
Superdex 200	2.8	43761.5	15629.1	9.8	187.2

2.2 重组过氧化氢酶的某些性质

2.2.1 温度对酶活力的影响: 分别在不同温度下按常规方法测定酶活力, 结果发现, 温度对酶活力的影响较小, 在 40 $^{\circ}$ C ~ 70 $^{\circ}$ C 时 Q_{10} 小于 1.1, 这与低温过氧化氢酶的结果类似。结果表明重组酶反应的最适温度为 70 $^{\circ}$ C (图 2), 与文献报道的天然酶一致^[3]。

2.2.2 酶的热稳定性: 将酶液(蛋白含量为 39 μ g/mL)在 30 ~ 90 $^{\circ}$ C 分别保温 10min、30min 和 60min, 然后按常规方法测定酶活力, 以最初的酶活力作为 100%。结果表明该酶在

60℃以下非常稳定,保温 60min 酶活力基本不变。温度在 70℃以上酶失活较快,70℃保温 60min 酶活尚有 60%左右;而 80℃保温 10min 酶活已损失 40%,90℃保温 10min 酶活损失约 70%,保温 30~60min 酶活几乎损失殆尽(图 3)。

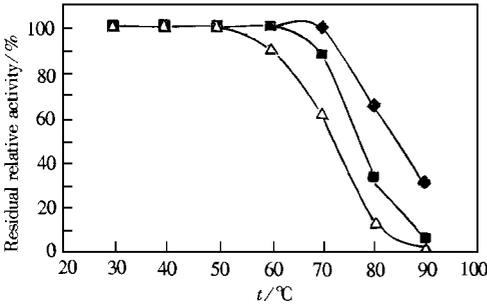


图 3 重组过氧化氢酶的稳定性

Fig.3 Thermal stability of recombinant catalase

◆ Incubation for 10 min ; ■ Incubation for 30min ;
 △ Incubation for 60min.

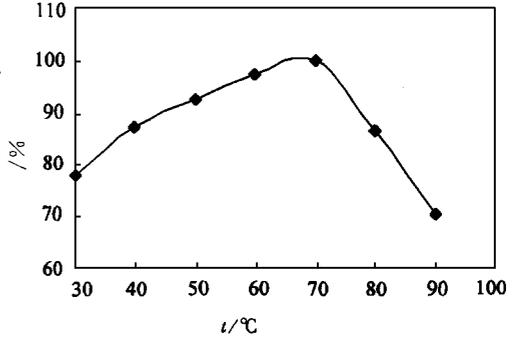


图 2 温度对酶活力的影响

Fig.2 Effect of temperature on activity

2.2.3 pH 对酶活力的影响:用 pH3.0~8.0 0.02mol/L 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液和 pH9.0~10.0 0.02mol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液分别配制底物,按常规方法测定酶活力,结果(图 4)表明酶的最适 pH 为 7.0,pH 低于 5 时酶的催化反应几乎不能进行,而文献报道天然酶的最适 pH6.0^[3]。

2.2.4 pH 稳定性 将酶液(蛋白含量为 39μg/mL)与 pH3.0~8.0 0.02mol/L 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液和 pH9.0~10.0 0.02mol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液混合,室温放置 24h,按常规方法测定酶活力。结果表明酶在 pH3~8 的范围内是比较稳定的,在 pH5~7 的范围内酶活损失很小(图 5)。

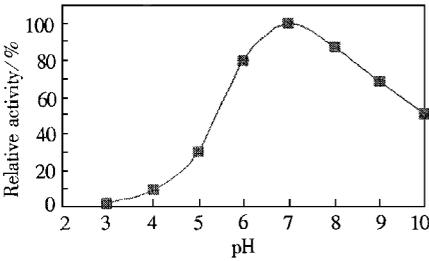


图 4 pH 对酶活力的影响

Fig.4 Effect of pH on activity

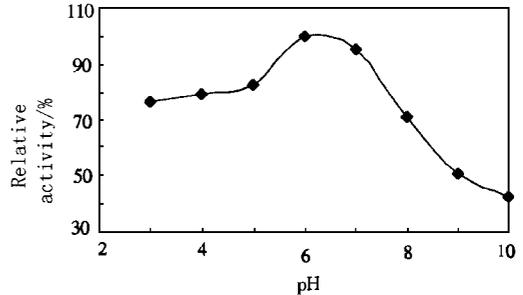


图 5 重组过氧化氢酶的 pH 稳定性

Fig.5 pH stability of recombinant catalase

2.2.5 酶的动力学参数:以 2.5、5、7.5、10、12.5、15mmol/L 的 H₂O₂ 作为底物,测定酶活力,用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法(图 6),求得 K_m 值为 7.75mmol/L,V_{max} 为 27.8mol·min⁻¹·mg⁻¹,与天然酶的 K_m 值为 7.5 基本一致^[3]。

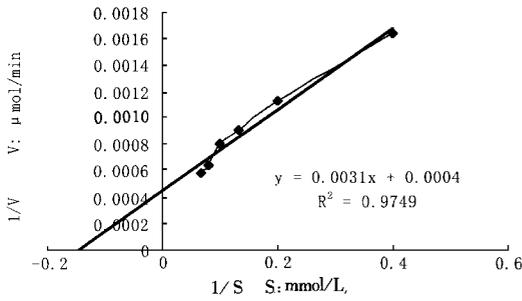


图6 重组过氧化氢酶的双倒数图

Fig.6 Lineweave-Burk plot of the recombinant catalase

2.2.6 金属离子和其它化合物对酶活力的影响 将各种化合物配成溶液与酶液(蛋白含量为 $39\mu\text{g}/\text{mL}$)在室温放置 2h,然后按常规方法测定酶活力,结果见表 2。实验表明铜离子有微弱的激活作用,许多金属离子有强烈的抑制作用,如 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 等 $1\text{mmol}/\text{L}$ 就可使酶活力完全丧失。 KCN 、 NaN_3 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、巯基乙醇对酶活力有抑制作用。 $50\text{mmol}/\text{L}$ 的 EDTA 对酶活力没有影响。

3 讨论

微生物酶的分离纯化历来是酶学研究中最为重要同时也最棘手的问题,尤其是对分子量较大的酶更是如此,如果是金属酶则更加麻烦。而大多数过氧化氢酶的分子量都在 $2.2 \sim 2.7 \times 10^5$ 之间,具有 4 亚基,含有金属铁;另一类过氧化氢酶不含铁,而含锰,具有 4 或 6 个亚基,亚基分子量大约 3.5×10^4 ;还有一类与嗜热脂肪芽孢杆菌过氧化氢酶类似,含有铁,具有 2 个亚基,亚基分子量在 8×10^4 多。从原始菌中提纯过氧化氢酶步骤较繁琐,活力回收较低。而我们将嗜热脂肪芽孢杆菌的过氧化氢酶基因克隆进大肠杆菌,表达的过氧化氢酶的量占可溶性蛋白的 $10\% \sim 20\%$,纯化较为容易,经过热处理、硫酸铵分级沉淀和离子交换层析,酶已去除了绝大部分杂蛋白,收率接近 50% ,比酶活提高约 120 倍。

重组酶具有良好的热稳定性和 pH 稳定性,最适温度为 70°C ,最适 pH7.0,与天然酶比较接近。比已发现的来源于嗜热链霉菌的过氧化氢酶热稳定性要好,但比来源于 *Thermus* 属的细菌稍差,而目前发现的该属细菌所产过氧化氢酶均为含锰过氧化氢酶。重组酶与目前的商品过氧化氢酶(来源于牛肝、微球菌、黑曲霉以及近年 Novozyme 公司的遗传修饰生物 GMO)相比具有热稳定性好的优势,具有大规模生产的潜力。

我们发现金属离子强烈抑制该酶活性, Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 等 $1\text{mmol}/\text{L}$ 就可使酶活力完全丧失,二价和三价铁离子和钙离子也有较强的抑制作用,低浓度的 EDTA 不抑制酶活。

表 2 金属离子及其它化合物对酶活力的影响

Table 2 Effect of some compounds and metal ions on activity

Compounds and ion	Concentration(mmol/L)	Relative activity/%
control	/	100.0
Cu^{2+}	1	106.8
Fe^{2+}	1	11.4
Fe^{3+}	1	9.1
Zn^{2+}	1	0.0
Co^{2+}	1	90.9
Mg^{2+}	1	97.7
Ba^{2+}	1	0.0
Ca^{2+}	1	40.9
Mn^{2+}	1	0.0
EDTA	10	100.0
	50	100.0
KCN	0.01	22.7
	0.1	6.8
NaN_3	1	40.9
	10	0.0
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	1	80.5
2-Mercaptoethanol	1	0.0

这一现象在过氧化氢酶中尚未见报道。与已报道的嗜热链霉菌的过氧化氢酶完全不同： Fe^{3+} 和 Ca^{2+} 对该酶有激活作用， Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 不影响酶活力，EDTA 强烈抑制酶活力^[9]。已报道的 *Thermoleophilum album* 的锰过氧化氢酶也不受低浓度 (5mmol/L) EDTA 的抑制，但没有相关金属离子的报道^[4]。由此可见，不同来源的过氧化氢酶对金属离子等因素的需求和反应差别很大。而这一现象与产气气杆菌中得到的 α 乙酰乳酸脱羧酶的类似^[10]。

参 考 文 献

- [1] 周 一, 严自正, 卢运玉, 等. 微生物学报, 1990, 30(3) : 223 ~ 227.
- [2] Patrick D. *Chimica Oggi*, 1996, 14(1) : 19 ~ 21.
- [3] Loprasert S, Negoro S, Okada H. *Journal of General Microbiology*, 1988, 134 : 1971 ~ 1976.
- [4] Allgood G s, Perry J J. *J Bacteriology*, 1996, 168(2) : 563 ~ 566.
- [5] Kagawa M, Murakoshi N, Nishikawa Y, et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 362(2) : 346 ~ 355.
- [6] Aebi H E. Catalase. In : Bergmeyer H U. ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol3. 3rd. Weinheim : Verlag Chemie, 1983. 273 ~ 285.
- [7] Lowry O H, Rousebrough N J, Farr A L, et al. *J Biol Chem*, 1951, 193 : 265 ~ 275.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory press. 1989.
- [9] 周 一, 严自正, 张树政. 微生物学报, 1990, 30(5) : 336 ~ 343.
- [10] 尹 东, 曾庆华, 卢大宁, 等. 生物工程学报, 1999, 15(4) : 501 ~ 506.

Purification and Properties of Thermostable Catalase in Engineered *E. coli*

Wang Fanqing Wang Zhengxiang Shao Weilan Liu Jiquan Xu Chengyong Zhuge Jian
(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School
of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract : A thermostable catalase in engineered bacterium *E. coli* was purified to electrophoretic homogeneity by heat treatment, ammonium sulfate fractionation precipitation, DEAE-A50 ion exchange chromatography, HiPrep® 16/10 Phenyl hydrophobic interaction chromatography and Superdex200 HR 10/30 size exclusion chromatography with 187.2-fold purification and 9.8% recovery. The optimum reaction temperature and pH of this recombinant catalase were 70°C and 7.0 respectively. The catalase is stable below 60°C and at pH range 3 ~ 8. The residual activity of the catalase was about 60% after treated at 70°C for 60 minutes and 80°C for 10 minutes. The apparent K_m and V_{max} value of the catalase were 7.75 mmol/L and 27.8mmol·min⁻¹·mg⁻¹ respectively. The affects of some metal ions and compounds on this enzyme were shown. Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} of 1mmol/L could completely inactivate the enzyme, EDTA of 50mmol/L had no affect on activity.

Key words : Recombinant *E. coli*, Catalase, Purification, Properties