

两种类型聚半乳糖醛酸酶的提纯及性质

王红梅* 刘兰英

(吉林大学分子生物学系 长春 130023)

摘要 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) AS 3.3883 所产果胶酶经 DEAE Sephadex A50 及 Sephadex G100 柱层析分离出电泳纯的两种聚半乳糖醛酸酶 (PG1, PG2), 并对它们的性质及结构进行了比较研究。结果证明两种酶作用的最适条件、动力学性质、分子量、氨基酸组成及金属离子对酶活力影响等方面有很大差异, 但二者的每个摩尔的活力及酶的构象很相似。

关键词 聚半乳糖醛酸酶, 性质, 结构

目前关于 PG 的研究主要侧重于酶的作用方式, 而且大多数只限于一种类型的 PG 研究^[1-4], 对两种类型的 PG 报道甚少, 尤其是关于其酶学性质及结构方面的研究尚无报道。本文从黑曲霉 (*Aspergillus niger*) AS3.3883 产的果胶酶粗品分离提纯了两种类型的聚半乳糖醛酸酶, 并较全面系统的研究了二者的异同点, 揭示了两种不同类型的聚半乳糖醛酸酶的性质及结构。

1 材料和方法

1.1 聚半乳糖醛酸酶活力测定

将 1% 果胶溶液(用 0.1 mol/L pH4.6 醋酸盐缓冲液配制) 5 ml 与聚半乳糖醛酸酶液 1 ml 混合, 于 50℃ 恒温水浴中反应 20 min, 然后在沸水浴中煮沸 10 min 以终止反应。取 1 ml 反应液按 Nelson-Somogyi 法^[5]测定还原糖含量。用 1 ml 加热失活的酶液代替聚半乳糖醛酸酶作为空白对照。以半乳糖醛酸为标准品制备标准曲线。

酶活力定义: 在 50℃, 每分钟催化果胶分解生成 1 μ mol 游离半乳糖醛酸的酶量为一个活力单位 (U)。

1.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按 Laemmli 的系统^[6]进行。

1.3 酶分子量的测定

采用 Sephadex G100 柱层析法进行测定^[7]。

1.4 氨基酸组成分析

取 1 mg 酶, 加入 2.5 ml 6mol/L HCl, 于 110℃ 分解 20 h, 蒸干, 水洗 3 次, 稀释成 150 μ g/ml, 用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。

1.5 圆二色谱的测定

* 吉林大学九〇级研究生, 现在北京大学生物系工作。

本文于 1994 年 4 月 21 日收到。

将酶溶于 0.1 mol/L pH5.0 的醋酸缓冲液 (0.1mg/ml) 中, 用日本产 Jasco-50 型圆二色谱仪在远紫外区 200~300 nm 测定酶的构象。

1.6 聚半乳糖醛酸酶的分离提纯

1.6.1 DEAE Sephadex A50 柱层析: 取 1 g 果胶酶粗品溶于 30 ml 0.05mol/L pH6.0 磷酸缓冲液中, 于 0~4℃ 放置 24 h, 离心 (3000r/min, 20min), 取上清 17 ml 加到经上述缓冲液平衡的 DEAE Sephadex A50 柱上, 分别用含 0.2 mol/L NaCl 和 0.4 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L pH6.0 磷酸缓冲液进行分段洗脱后, 监测每管洗脱液的 280 nm 的吸光度和酶活力, 收集活力峰。

1.6.2 Sephadex G100 柱层析: 将上述收集的活力峰浓缩至 2 ml 左右, 加到经含 0.5mol/L NaCl 的 0.1 mol/L pH5.0 的醋酸缓冲液平衡的 Sephadex G100 柱上, 用相同缓冲液洗脱, 监测每管洗脱液的 280 nm 的吸光度和酶活力, 收集活力峰, 冻干得聚半乳糖醛酸酶精品。

2 结果和讨论

2.1 两种聚半乳糖醛酸酶的分离提纯

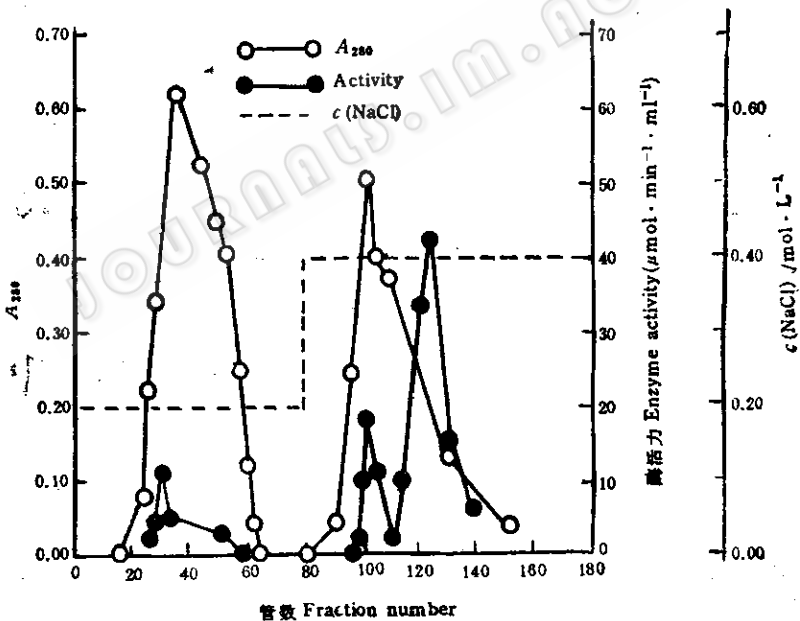


图 1 果胶酶的 DEAE Sephadex A50 柱层析

柱: 2.5 Φ \times 80 cm; 流速: 24 ml/h; 分部收集体积: 6 ml; 用 0.05 mol/L pH6.0 的磷酸缓冲液平衡。分别用含 0.2 mol/L NaCl 和 0.4 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L pH6.0 磷酸缓冲液洗脱。
Fig. 1 DEAE Sephadex A50 chromatography of pectinase
Column(2.5 Φ \times 80 cm); Flow rate: 24 ml/h; Fraction volume: 6 ml; Equilibrated with 0.05 mol/L pH6.0 phosphate buffer. Eluted with 0.1 mol/L pH6.0 phosphate buffer containing 0.2 mol/L NaCl and 0.4 mol/L NaCl, respectively.

2.1.1 DEAE Sephadex A50 柱层析: 果胶酶粗品在 DEAE Sephadex A50 柱层析的

洗脱曲线如图 1 所示。分别收集并测定各个活力峰的活力。其纯度及收率列于表 1。

由图 1 和表 1 可见, 用含 0.2 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L pH6.0 磷酸缓冲液洗脱后, 得到一个蛋白峰 1, 该峰酶活力很低 (总活为 $299 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$), 杂蛋白含量很高 ($0.33 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), 比活很低 ($21.6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), 是杂蛋白峰。用含 0.4 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L pH6.0 磷酸缓冲液洗脱后, 测定各管活力, 得到两个明显的活力峰, 收集 101~106 管为峰 2, 收集 116~130 管为峰 3。

2.1.2 Sephadex G100 柱层析: 将收集的峰 2、峰 3 分别置于透析袋中, 用聚乙二醇浓缩至 2 ml 左右, 分别上 Sephadex G100 柱, 洗脱曲线如图 2 和图 3 所示, 酶的纯度及收率列于表 1。

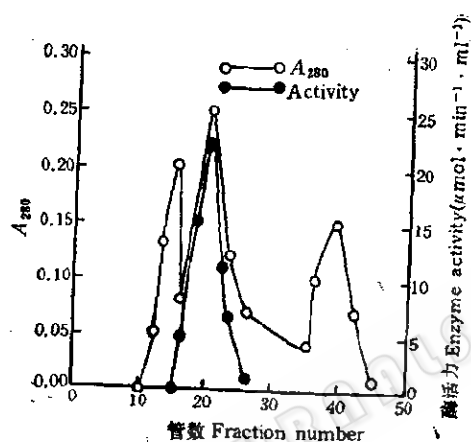


图 2 峰 2 的 Sephadex G100 柱层析

柱 ($1.5\Phi \times 100\text{cm}$); 流速: 12 ml/h; 分部收集体积: 4 ml; 用含 0.5 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L pH5.0 醋酸缓冲液平衡和洗脱。

Fig. 2 Gel filtration of peak2 on Sephadex G100 Column ($1.5\Phi \times 100\text{cm}$); Flow rate: 12ml/h; Fraction volume: 4ml; Equilibrated and eluted with 0.1mol/L pH5.0 acetate buffer containing 0.5 mol/L NaCl.

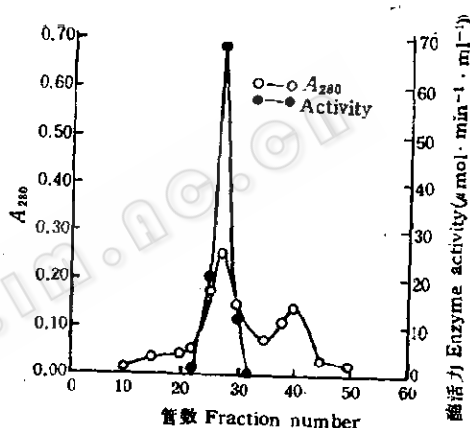


图 3 峰 3 的 Sephadex G100 柱层析

柱 ($1.5\Phi \times 100\text{cm}$); 流速: 12 ml/h; 分部收集体积: 4 ml; 用含 0.5 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L pH5.0 醋酸缓冲液平衡和洗脱。

Fig. 3 Gel filtration of peak3 on Sephadex G100 Column ($1.5\Phi \times 100\text{cm}$); Flow rate: 12ml/h; Fraction volume: 4ml; Equilibrated and eluted with 0.1mol/L pH5.0 acetate buffer containing 0.5mol/L NaCl.

峰 2 经 Sephadex G100 柱层析分离 (图 2) 得到三个蛋白峰, 其中只有一个峰为活力峰, 收集此峰 (18~24 管) 为聚半乳糖醛酸酶 1 (PG1)。

峰 3 经 Sephadex G100 柱层析 (图 3) 分离得到一个活力峰, 收集此峰 (25—30 管) 为聚半乳糖醛酸酶 2 (PG2), PG2 为自制果胶酶的主要组份, 活力回收为 56.4%, PG 分离提纯各步骤的总结列于表 1。

2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

PG1 和 PG2 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定均为一条带 (图 4)。

2.3 聚半乳糖醛酸酶的性质

2.3.1 酶作用的最适温度: 按照活力测定方法, 在不同温度下测定酶活力, 发现 PG1 和

表 1 PG 分离提纯各步骤的总结

Table 1 Summary of PG purification

步骤 Step	体积 Volume (ml)	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	比活 Specific activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	活力回收 Yield (%)	提纯倍数 Purification factor
粗酶液 Crude Enzyme	17	167.3	4947	29.6		
峰1 Peak 1	42	13.9	299	21.6	6.0	0.73
峰2 Peak 2	48	9.6	510	53.2	10.3	1.72
峰3 Peak 3	112	20.2	3192	158.3	64.5	5.34
PG1	20	4.0	417	104.3	8.4	3.52
PG2	40	9.2	2791	303.3	56.4	10.11

GP2 的最适温度分别为 52℃ 和 56℃。

2.3.2 酶作用的最适 pH: 在不同 pH 的 0.1 mol/L 的醋酸缓冲液中测定酶活力, 结果表明 PG1 和 PG2 的最适 pH 分别为 4.0 和 4.2。

2.3.3 酶作用的最适离子强度: 在不同离子强度的 pH 4.0、4.2 和 4.6 的醋酸缓冲液中测定酶活力, 发现在 pH 4.0 时 (PG1 的最适 pH) PG1 作用的最适离子强度为 0.10 mol/L, 在 pH 4.2 及 4.6 时都是 0.15 mol/L。对于 GP2, 在其最适 pH 4.2 时, 其最适离子强度为 0.05 mol/L, 而在 pH 4.0 及 pH 4.6 时, 其最适离子强度均为 0 mol/L。离子强度对维持酶构象的离子键的破坏和形成有重要作用, pH 值则主要影响酶的某些基团的解离, 这些影响都会导致酶构象的变化。两种影响相互叠加, 使 PG1 在其最适 pH 值时有着较低的最适离子强度; PG2 在其最适 pH 值时有着较高的最适离子强度。这一结果显示 PG1 和 PG2 的活性中心附近带电状态的差异。

2.3.4 酶的热稳定性: 将酶溶于 0.1 mol/L pH 4.6 的醋酸缓冲液中, 在不同温度下保温 1 h 后测定酶活力。结果表明, PG1 在 55℃ 保温 1 h 后, 活力基本不变。在 60℃ 保温后, 大部分活力丧失。PG2 在 35℃ 保温 1 h 后, 活力基本不变, 温度再

升高, 酶明显失活。从前述结论可知, PG2 的最适反应温度为 52℃, 而热稳定温度在 35℃, 二者并不矛盾, 这可能是由于测定最适反应温度时, 酶先与底物混和后再保温, 酶与底物结合形成酶-底物复合物, 稳定了酶构象, 因而最适反应温度较高。而测定酶的热稳

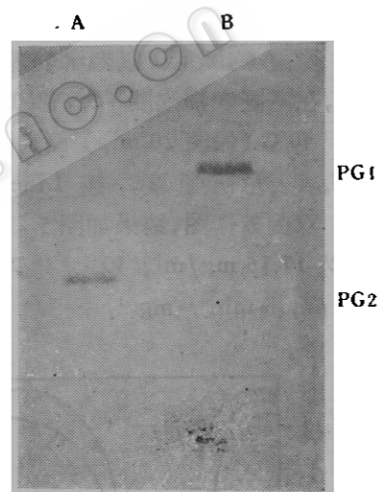


图 4 PG1 和 PG2 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

用垂直板型电泳仪, 在非还原条件下进行电泳, 分离胶浓度为 10%, 上样量为 2 μg 蛋白, 染色用 0.05% 的考马斯亮蓝 R-250。泳道 A: PG2; 泳道 B: PG1。

Fig. 4 SDS-PAGE of PG1 and PG2. Electrophoresis was performed under non-reduced condition in a slab gel consisted of 10% polyacrylamide. Protein (2 μg) was applied to the gel and was stained with 0.05% Coomassie brilliant blue R-250. Lane A: PG2; Lane B: PG1.

定性时,是先将酶液保温后,再加底物,由于保温时没有底物的保护作用,使酶在较低温度下就很容易变性失活。

2.3.5 酶的 pH 稳定性: 将酶溶于不同 pH 的醋酸缓冲液中,放置 1 h 后,测定酶活力。结果表明, PG2 的 pH 稳定范围为 5.0~6.5,在 pH2.0~4.0 时,PG2 容易失活,但仍保留部分活力,在 pH > 6.0 时,几乎完全失活,说明在中性及碱性条件下,PG2 的构象很易改变,导致酶活力丧失。PG1 的 pH 稳定范围为 4.0~9.0。在过酸 (pH1.0~4.0) 和过碱 (pH9.0~11.0) 条件下至少都保留 50% 活力,说明 PG1 的构象较 PG2 稳定。

2.3.6 酶的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 的测定: 以聚半乳糖醛酸为底物,在不同底物浓度 (2.5~10mg/ml) 下,于 50℃ (保温 20 min) 测定酶活力,以 A_{620} 表示初速度,按 Lineweaver-Burk 双倒数作图,结果如图 5。PG1 的 K_m 为 17.15 mg/ml, V_{max} 为 $753 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, PG2 的 K_m 为 5.71 mg/ml, V_{max} 为 $1044 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

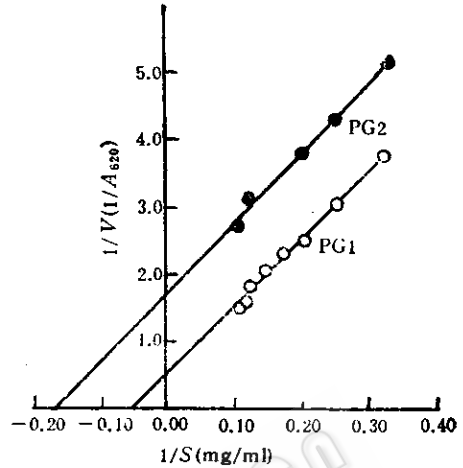


图 5 PG1 和 PG2 催化聚半乳糖醛酸水解的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 5 Lineweaver-Burk plot of PG1 and PG2 in catalyzing hydrolysis of polygalacturonic acid

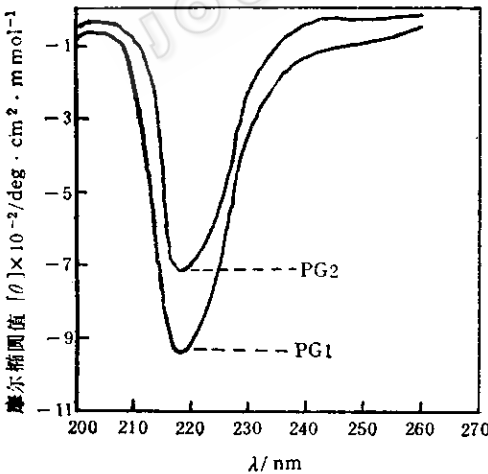


图 6 PG1 和 PG2 的圆二色谱图

Fig. 6 The CD spectra of PG1 and PG2

2.3.7 分子量的测定: 用 Sephadex G100 柱层析法测定酶的分子量,以牛血清白蛋白、卵清蛋白、胰酶抑制剂和溶菌酶为标准品,测得 PG1 的分子量为 79 500, PG2 的分子量为 30 000。

2.3.8 金属离子对酶活力的影响: 在测定系统中分别加入不同的金属离子,使其终浓度为 5 mmol/L,测定酶活力,以不加金属离子的酶活力为 100%,结果列于表 2 中。Mg²⁺、Ca²⁺ 和 Fe³⁺ 对 PG1 有激活作用,Al³⁺、Cu²⁺ 和 Fe³⁺ 对 PG2 有激活作用;Hg²⁺ 对 PG1 有抑制作用,Ca²⁺、Hg²⁺ 对 PG2 有抑制作用。

2.4 酶的圆二色谱

PG1 和 PG2 经圆二色谱仪扫描的

图谱如图 6。

PG1 和 PG2 显示出相似的圆二色谱图,即均在 218 nm 处有单一负峰,而在 208nm

表 2 不同金属离子对酶活力的影响
Table 2 Effect of metal ions on PGs' activity

金属离子 Metal ions	0	MgCl ₂	CaCl ₂	AlCl ₃	CuCl ₂	FeCl ₃	HgCl ₂
PG1 相对活力(%) Relative activity	100	143	143	102	107	134	0
PG2 相对活力(%) Relative activity	100	100	88	122	119	114	0

处没有负峰,这表明 PG1 和 PG2 均以 β -折叠结构为主。

2.5 氨基酸组成分析

氨基酸组成测定结果如表 3。

表 3 PG1 和 PG2 的氨基酸组成
Table 3 Amino acid composition of PG1 and PG2

种 类 Type	PG1		PG2	
	数目 Number	百分含量(%) Percentage	数目 Number	百分含量(%) Percentage
Asx*	91	16.3	37	16.4
Glx**	52	10.2	20	9.8
Gly	77	7.8	22	5.5
Thr	65	10.3	19	7.5
Ser	77	10.7	22	7.7
Ala	27	3.2	13	3.9
Val	47	7.3	16	7.0
Ile	46	8.0	14	6.1
Leu	30	5.2	16	7.0
Lys	25	4.9	8	3.9
Phe	19	4.3	9	5.0
Arg	11	2.6	5	2.9
His	7	1.5	4	2.1
Tyr	9	2.1	7	4.2
Met	5	1.0	15	7.5
Pro	26	4.1	15	3.8

注: *数目为 Asp 与 Asn 之和; ** 数目为 Glu 与 Gln 之和。

Note: * is the sum of Asp and Asn.

** is the sum of Glu and Gln.

由表 3 可见, PG1 和 PG2 的酸性氨基酸和碱性氨基酸百分含量很相似,二者均含有较少的碱性氨基酸及相对较多的酸性氨基酸。

综上所述, PG1 和 PG2 虽在许多性质方面都有差异,但二者也有许多相似之处,例如: 二者的每摩尔活力很相近,虽然 PG1 和 PG2 的比活相差很大,分别为 $104.3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $303.3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 但分子量差异很大,分别为 79 500 和 30 000, 计算二者的每摩尔活力发现很相近,说明一个分子的 PG1 与一个分子的 PG2 有相近的

催化能力;在氨基酸组成上二者的碱性氨基酸的含量远低于酸性氨基酸,均为酸性蛋白质;CD谱也揭示出二者有类似的构象,均含有大量的 β -折叠结构。

参 考 文 献

- [1] Richard B. *Eur J Biochem*, 1984, 144(2): 217~221.
- [2] Lim J, Yamasaki Y, Suzuki Y *et al. Agric Biol Chem*, 1980, 44(3): 473~480.
- [3] Heirichová K. *Collection Czechoslov Chem Commun*, 1977, 42(11): 3214~3221.
- [4] Heinrichová. K. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 422(2): 349~356.
- [5] Somogyi M. *Biochemistry*, 1952, 19: 195.
- [6] Laemmli U K. *Nature*, 1970, 227: 680.
- [7] Andrews P. Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. In: Glick D ed. *Methods of Biochemical Analysis*. New York: John Wiley, 1970. 18: 1.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TWO TYPES OF POLYGALACTURONASE

Wang Hongmei Liu Lanying

(Department of Molecular Biology, Jilin University, Changchun 130023)

Abstract Two types of polygalacturonases (PG1 and PG2) were separated and purified by DEAE-Sephadex A50 and Sephadex G100 from crude pectinase produced from *A. niger* AS 3.3883. Some properties and structures were investigated with purified enzyme of PG1 and PG2. The results indicate that the optimum conditions of their activity, kinetic parameters, molecular weight, composition of amino acids and the effects of some metal ions on activity of the enzymes are markedly different from each other, while the molar activity and the conformations of the two types of PG are similar.

Key words Polygalacturonase, Purification, Characterization