

工程菌人溶菌酶的纯化和性质*

叶 军 钱世钧

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

提 要 将人溶菌酶工程菌株在发酵培养、菌体经超声破碎、变性和复性后所得的粗酶液经 Express-Ion S 阳离子交换柱层析,得到电泳纯的酶,比活达到 48 000 u/mg。此酶的最适 pH 为 6.5,等电点为 8.91,对溶壁微球菌的米氏常数 $K_m = 0.0311 \text{ mg/mL}$,60°C 保温 30 min,酶活力剩余 48.3%。N 末端氨基酸序列除了第一个 Met,其余 4 个与预期相符。一些重金属离子对酶的活性影响不尽相同,在 0.01 mol/L 的浓度下 Cu^{2+} 可使该酶完全失活。

关键词 重组人溶菌酶 纯化 性质

分类号 Q55 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)01-0055-59

天然人溶菌酶主要存在于人奶、人胎盘和唾液等中,不易提取,且价格昂贵。而通过人工合成基因,用微生物发酵法生产人溶菌酶将为其在食品、医药等方面的广泛应用提供有利条件。本实验室已经成功地合成了人溶菌酶基因并构建重组质粒^[1~2],在 *E. coli* 中得到了高水平表达^[3]。本文在此基础上对该酶进行了纯化,得到 SDS-PAGE 纯的酶,并对其性质作了一些研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

工程菌株 JBP-HLY,由本课题组构建。

1.2 仪器和试剂

Express-Ion S 阳离子交换剂、卵清溶菌酶、溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)均为 Sigma 公司产品。测定等电点的标准蛋白及电泳装置为 Pharmacia 公司产品,Ampholine 为 LKB 公司产品。其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 菌体制备、粗酶液的提取及酶活性的测定方法

见参考文献 [3~4]。

1.4 人溶菌酶的纯化

将粗酶液经冷冻干燥浓缩,对 0.01 mol/L, pH 5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液透析,再通过经上述缓冲液平衡的 Express-Ion S 阳离子交换柱,用 0~1 mol/L NaCl 进行梯度洗脱。收集活性部分的下柱液,用聚乙二醇反透析浓缩,利用 SDS-PAGE 检查纯度。

1.5 蛋白含量和等电点测定

蛋白含量用 Folin-phenol 法测定^[5]。等电点测定参照文献 [6] 进行。

*“八五”国家科技攻关项目(No. 85-722-05-02)

收稿日期:1997-07-18,修回日期:1997-12-25

2 结果

2.1 酶的分离纯化

按材料和方法所述进行分离纯化,洗脱曲线见图 1 纯化结果见表 1。从结果可看出,收率为 3.8% 纯度提高了 12.9 倍。SDS-PAGE 检查结果见图 2,为一单一泳带。

表 1 工程菌人溶菌酶的纯化

Table 1 Purification of Human lysozyme from engineered bacterium *E. coli*

步骤 Steps	总活力/u Total act.	总蛋白/mg Total pro.	比活/(u/mL) Spec. act	纯化倍数 Pur. fold	收率/% Act. rec.
Crude enzyme	1.7×10^5	49.5	3 454	1.0	100
Express-Ion S	9.1×10^4	1.9	4 8000	12.9	3.8

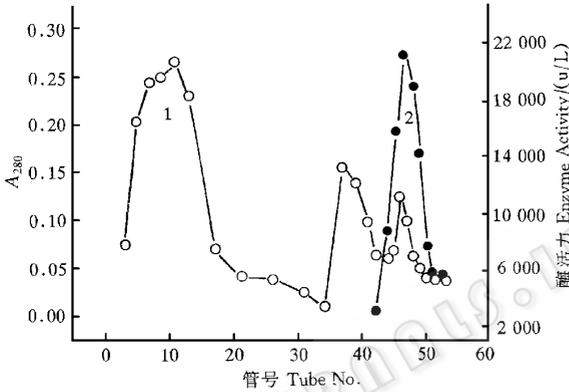


图 1 人溶菌酶纯化曲线

Fig. 1 Chromatography of the Human lysozyme on Express-Ion S

1. A_{280} ;
2. 酶活 Enzyme activity.

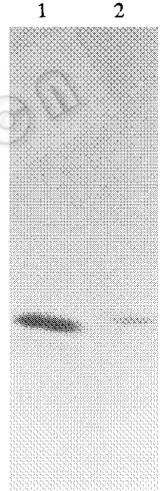


图 2 人溶菌酶的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of the Human lysozyme
1. 卵清溶菌酶 Egg white lysozyme (14.3 kD);
2. 人溶菌酶 The Human lysozyme (14.7 kD).

2.2 酶的最适反应温度

选取不同温度条件,测定纯酶活性,结果表明,酶的最适反应温度为 45°C (图 3)。

2.3 酶的最适反应 pH

选择不同缓冲液配制底物溶液,浓度为 0.2 mg/mL,其它条件不变,测定酶活力。结果见图 4。在磷酸缓冲液和磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中的最适反应 pH 均为 6.5,在 Tris-HCl 缓冲液中的酶活性较其它缓冲液为高,最适反应 pH 为 8.0。各种缓冲液所显示的最适反应 pH 略有差别。在一定范围内,该酶在 Tris-HCl 和磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中对 pH 敏感程度较差,而在磷酸缓冲液中对 pH 敏感程度最大。

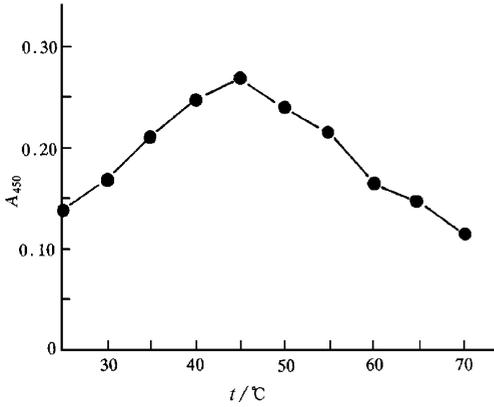


图3 人溶菌酶反应最佳温度

Fig.3 Optimum temperature of the Human lysozyme

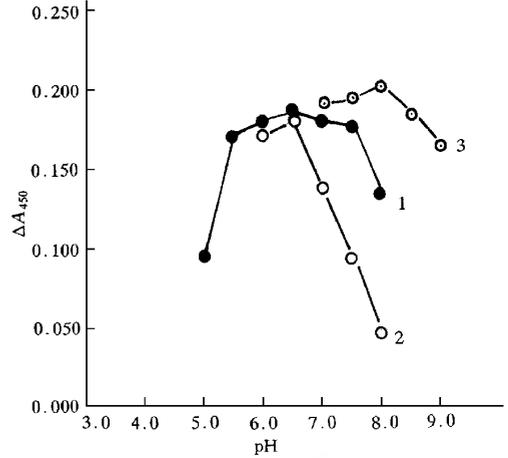


图4 人溶菌酶的最适反应 pH

Fig.4 Optimum reaction pH of the Human lysozyme
Na₂HPO₄-citrate 2. Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 3. Tris-HCl.

2.4 酶的热稳定性

将等量酶液分别置于不同温度下 30 min,冷却后于 37°C 按常规方法测酶活性,结果见图 5。酶在 45°C 以前稳定性较好,而在 60°C 加热 30 min,酶活剩余 48.3%。

2.5 等电点测定

利用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,Ampholine 的 pH 范围是 3~10,测得此酶等电点为 8.91。

2.6 N-末端氨基酸序列测定

利用北京大学生命科学学院 ABI 491 型蛋白测序仪测得酶的 N-末端 5 个氨基酸依次为 Met、Lys、Val、Phe 和 Glu,除了 Met 外,其它氨基酸与人工合成 DNA 序列所预期的 N-氨基酸顺序一致。第一个 Met 是由于 DNA 序列中起始密码子 ATG 也被翻译所至。

2.7 酶的米氏常数

以 *Micrococcus lysodeikticus* 为酶的底物,分别配制 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/mL 的浓度,测定酶活力,用双倒数法作图(图 6),得到 $K_m = 0.0311\text{mg/mL}$ 。

2.8 金属离子对酶活性的影响

选取不同金属离子分别加入酶溶液,终浓度为 0.01mol/L 时测定酶活力,结果见表 2。结果表明,以上各种离子都对酶活力有影响,其中 Cu^{2+} 最显著,酶活力全部丧失。

表 2 一些金属离子对人溶菌酶的影响

Table 2 The effects of some ions on the Human lysozyme

离子 Ion	No ion	Cu^{2+}	Fe^{3+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Co^{+}	Hg^{2+}	Ni^{+}	Mn^{2+}	Ca^{2+}
相对活力/% Re. act.	100	0	35.7	42.5	47.5	71.4	75.0	78.6	78.6	80.0

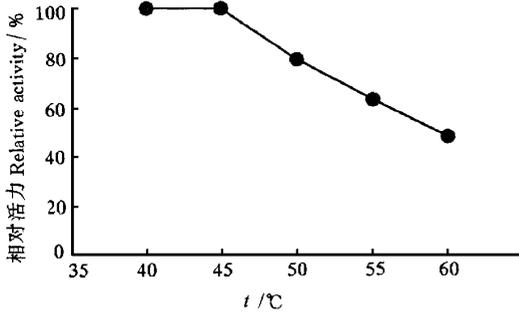


图5 人溶菌酶的热稳定性

Fig.5 Thermostability for the human lysozyme

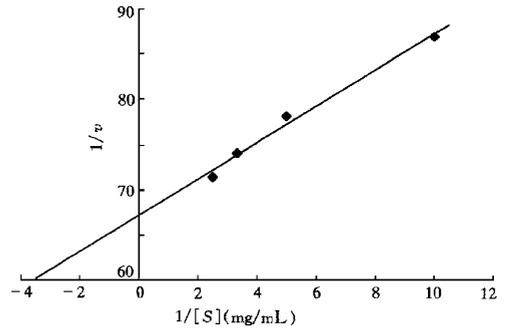


图6 双倒数法测人溶菌酶的米氏常数

Fig.6 Lineweaver-Burk plot of the Human lysozyme

3 讨论

在工程菌 JPB-Hly 表达的人溶菌酶以不溶性的、没有生物活性包涵体形式积累,这对于获取有活性的酶带来不少困难,但对酶的纯化却是非常有利的。在包涵体的变性、复性过程中去除了很多杂蛋白,所以经一步离子交换层析即得到电泳纯的人溶菌酶,纯化步骤很简单。我们曾利用凝胶过滤,但效果不如离子交换层析。因为凝胶过滤的上柱体积要求很小,而粗酶液的体积达 300~400 mL,不易浓缩。

天然人奶溶菌酶的最适 pH 为 6.35^[7],与基因工程人溶菌酶(以下简称工程酶)十分接近。该工程酶的热稳定性较鸡卵清溶菌酶和天然人溶菌酶差。从结构上和焓值 ΔH 的分析^[8]表明,人溶菌酶的热稳定性高于鸡卵清溶菌酶。而工程酶系从包涵体经变性、复性而来,蛋白质重折叠后的构象可能与天然的人溶菌酶有一定差异,对酶活性区域无影响,而对其热稳定性产生影响。

不同的金属离子对工程酶的活力影响各不相同。 Cu^{2+} 浓度为 0.01mol/L 即可使该酶完全失活,而相同浓度的 Ca^{2+} 、 Ni^{+} 、 Mn^{2+} 对酶活力的影响远远小于 Cu^{2+} 。 Cu^{2+} 对该酶影响很大,有文献报道 Cu^{2+} 可在 100°C pH7 时催化自由硫氢基的氧化,引起溶菌酶分子间、分子内二硫键的改变^[9],使酶不能维持稳定的构象,从而丧失活性。

参 考 文 献

- [1] 钱世钧,于颖,田开荣等.生物工程学报,1994,10(1):34~38.
- [2] 矫庆华,钱世钧,叶军等.生物工程学报,1997,13(1):111~113.
- [3] 郭良栋,钱世钧,叶军等.微生物学报,1997,37(1):53~57.
- [4] 钱世钧,陈欣,叶军等.生物工程学报,1996,12(增刊):266~268.
- [5] Lowry O H, Rousebrough N J, Farr A L *et al.* *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265~275.
- [6] 张树政,孟广震,何忠效主编.酶学研究技术.北京:科学出版社,1987.187~194.
- [7] Parry R M, Chandan R C, Shanani K M *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1969, **103**: 59~65.
- [8] Barel A O, Prieels J P, Maes E *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1972, **257**: 288~296.
- [9] Tomizawa H, Yamada H, Tanigawa K *et al.* *J Biochem*, 1995, **117**(2):369~373.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF HUMAN LYSOZYME IN ENGINEERED BACTERIUM *E. COLI* *

Ye Jun Qian Shijun

(Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080)

Abstract To obtain the SDS-PAGE-pure human lysozyme ,the crude enzyme of engineered bacterium *E. coli* was purified by chromatography on cation ionexchange of Express-Ion S. The optimum reaction temperature and pH of this lysozyme were 45°C and 6.5 , respectively. The isoelectric point is pH 8.91 , and K_m of the enzyme for *Micrococcus lysodeikticus* is 0.0311mg/mL. The thermal stability of the engineered enzyme is more sensible than hen egg white lysozyme and human milk lysozyme. The sequence of 5 amino acids in N-end is same as designed ,except an Met at the first. The affects of some metal ion on this enzyme were shown. Cu^{2+} of 0.01mmol/L could completely inactivate the enzyme.

Key words Recombinant Human lysozyme ,Purification ,Properties

* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(No. 85-722-05-02)