

文章编号: 1000 5013(2010)05-0552-05

重组粘质沙雷氏菌几丁质酶 C 的纯化及酶学性质

刘嘉, 贺淹才, 施腾鑫, 李梓君, 王珍珠

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 为从已构建的重组大肠杆菌 pET-22b-chiC 获得高纯的几丁质酶 C, 通过降低培养温度, 提高粘质沙雷氏菌几丁质酶 C 的可溶性表达. 表达产物经镍柱亲和层析(IMAC)和 Phenyl-Sepharose 疏水层析(HIC)分离纯化后, 得到电泳纯的几丁质酶. 酶学性质研究表明, 纯化的几丁质酶 C 为单体蛋白, 相对分子质量为 51.8 ku; 最适 pH 值为 5.0, 最适温度为 55 °C, 在 55 °C 的条件下保温 4 h 后仍有 90% 以上的酶活力. 研究结果还表明, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} 对酶活力均有明显抑制作用, 而 Fe^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{2+} , Ba^{2+} 对酶活力有一定促进作用, Mn^{2+} 对酶活力明显促进作用.

关键词: 粘质沙雷氏菌; 重组; 几丁质酶 C; 分离纯化; 酶学性质

中图分类号: TQ 920.6; TQ 929+.2

文献标识码: A

几丁质酶(EC 3.2.1.14)可以催化水解自然界中最为丰富的生物高聚物几丁质的 β -1, 4-糖苷键, 生成几丁寡糖. 在经典的基于氨基酸序列相似性的糖基水解酶分类系统中, 几丁质酶主要为第 18, 19 两个家族. 绝大多数的微生物几丁质酶属于第 18 家族, 而第 19 家族主要是植物几丁质酶, 其中在链霉菌属中也有 19 家族几丁质酶^[1]. 粘质沙雷氏菌是降解几丁质的细菌中最有效的菌株之一, 它的 chiA, chiB, chiC 3 个基因分别编码 18 家族几丁质酶 A, B 和 C. 几丁质酶 A, B 已经从不同的粘质沙雷氏菌中克隆表达, 并且获得 3-D 结构图^[2], 几丁质酶 C 也从粘质沙雷氏菌 2170, KCTC2172^[3], ATCC14041^[4] 中克隆表达. 几丁质酶 C 是粘质沙雷氏菌中唯一具有纤连蛋白 III 型结构域(Fibronectin Type III Domain)的几丁质酶, 其结构不同于几丁质酶 A, B^[5,6]. 到目前为止, 仍然没有得到几丁质酶 C 的晶体结构, 而且对其酶学性质的了解还不多. 本文从已经构建并能表达粘质沙雷氏菌几丁质酶 C 的重组大肠杆菌中分离、纯化得到该酶, 并对其进行初步酶学性质的研究.

1 材料与方法

1.1 材料

构建带有粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens* ATCC 14041) 几丁质酶基因 ChiC 的重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) pET-22b(+)-chiC, 胶体几丁质, HisTrap HP 亲和层析柱, Phenyl Sepharose FF (Low Sub) 层析柱, AKTA purifier 10/100, 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)等.

1.2 菌种的培养与粗酶液制备

挑取重组菌接种于 5 mL 的 Luria Bertani(LB) 液体培养基(含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素(Amp))中, 于 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 37°C 下过夜培养. 收集菌体抽提质粒并进行酶切鉴定^[7].

取过夜活化的重组菌, 按 1% 的接种量接种于新鲜的 LB 液体培养基中, 于 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 37°C 下继续培养至菌液的光密度值 $D(600)$ 为 0.5~0.6 时(约 2.5 h), 向培养基中加入 IPTG, 使 IPTG 的终浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 调整培养温度为 25°C , 继续诱导表达 8 h 后, 收获菌体.

将诱导后的菌液于离心机(4°C , $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 离心 5 min, 收集菌体, 弃上清液; 用 4~5 倍体积

收稿日期: 2009 02 22

通信作者: 贺淹才(1949), 男, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学的研究. E-mail: yche@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C04010011)

的 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS, 预冷, $\text{pH} = 7.0$)洗涤菌体, 离心收集菌体, 重复 3 次. 菌体沉淀按 1 g 湿菌体加入 10 mL 的 PBS 重悬, 冰浴超声破碎菌体(250 W , 2 s , 90 次); 于 4°C , $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min , 上清液即为粗酶液.

1.3 分离与纯化方法

(1) 镍柱亲和层析. 将粗酶液上样至预先用缓冲液 I ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液, $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑, $\text{pH} = 7.0$) 充分平衡的 HisTrap HP 亲和层析柱, 后用缓冲液 II ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液, $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠, $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑, $\text{pH} = 7.0$) 进行洗脱, 收集各峰, 检测酶活力.

(2) Phenyl-Sepharose 疏水层析. 将上述收集组分对缓冲液 III ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铵, $\text{pH} = 8.0$) 进行透析, 所得酶液上样至预先用缓冲液 III 充分平衡的 Phenyl-Sepharose 疏水层析柱, 后用缓冲液 IV ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 4% 异丙醇, $\text{pH} = 8.0$) 进行洗脱^[8], 收集各峰, 检测酶活力, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 确认几丁质酶的纯度.

1.4 测定方法

(1) 几丁质酶蛋白质浓度测定. 按照 Tsaffir Zor 方法^[9] 并稍作修改, 进行蛋白质浓度测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白质.

(2) 酶活力测定. 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS) 法^[10]. 在 2 mL 的 Eppendorf 管中, 加入 0.25 mL 纯化后的酶液、 0.25 mL 胶体几丁质、 0.5 mL 的 McIlvaine's 缓冲液($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 溶液与 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸溶液按一定比例混合, $\text{pH} = 5.5$), 50°C 反应 1 h , 煮沸 10 min . 冷却后, 加入 0.75 mL DNS, 煮沸 10 min ; 冷却后, 于室温下离心($4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min , 取上清液, 测定波长为 540 nm 的吸光度值. 以已知浓度的 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG) 做标准对照.

(3) 相对分子质量测定. 将样品及已知相对分子质量的标准蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后采用 Quantity one 凝胶成像分析软件进行几丁质酶相对分子质量测定.

2 实验结果

2.1 菌种的鉴定

含 pET-22b-chiC 质粒的重组菌经抽提、酶切之后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1 所示. 图 1 中, 泳道 1, 2, 3 分别为 DNA 相对分子质量、Hind II 单酶切产物, 以及 Hind II 和 Xho I 双酶切产物. 显然, 重组质粒 pET-22b-chiC 是由 $5\,490 \text{ bp}$ 的载体和约 $1\,500 \text{ bp}$ 的目的条带 ChiC 基因片段组合而成^[4].

2.2 几丁质酶分离与纯化

利用 HisTrap HP 柱(镍柱) 纯化几丁质酶, 其色谱峰和对应的酶活力曲线, 如图 2 所示. 从图 2 可明显看到, 第 1 个峰是流出液(即未结合到 HisTrap HP 柱上, 直接流出的组分, 其峰较高, 为方便观察, 故只截取局部), 尽管蛋白含量很高, 但酶活力很低, 说明主要是杂蛋白; 第 2 个峰为咪唑的洗脱峰, 虽然峰值低但酶活力相应较高. 从两个峰值的大小看, 表达的可溶性目的蛋白含量较低.

利用 Phenyl Sepharose FF(Low Sub) 疏水层析, 进一步纯化几丁质酶, 如图 3 所示. 疏水层析过程中共出现 2 个峰, 流出液形成第 1 个小峰, 洗脱之后出现的第 2 个峰含有较高的几丁质酶活性. 收集具有较高酶活性部分的洗脱液, 连同收集的镍柱纯化蛋白进行 SDS-PAGE 确认纯度.

将 HisTrap HP 柱纯化的几丁质酶与疏水柱纯化的几丁质酶进行 SDS-PAGE, 其结果如图 4(a) 所示. 图 4(a) 中, 泳道 1, 2, 3, 4 分别为蛋白相对分子质量、疏水柱纯化产物、HisTrap HP 柱纯化产物及粗酶液. 从泳道 3 可以看出, 样品中目标蛋白含量较高, 经凝胶成像系统进行分析显示目的蛋白质量分数约为 89.1% , 而泳道 2 即疏水纯化产物经凝胶成像系统分析, 除了目的蛋白外, 没有其他条带, 说明得

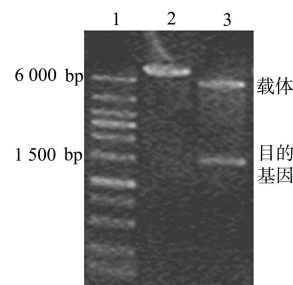


图 1 几丁质酶 C 重组质粒 pET-22b-chiC 的电泳验证
Fig. 1 Electrophoresis identification of recombinant plasmid pET-22b-chiC of chitinase C

到了电泳纯的目的蛋白.

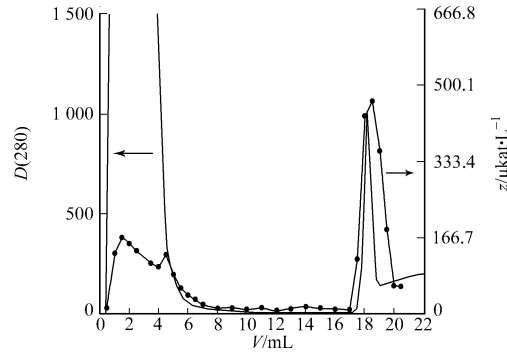


图 2 几丁质酶 C 的金属螯合层析柱图谱

Fig.2 Chromatography of chitinase C on IMAC

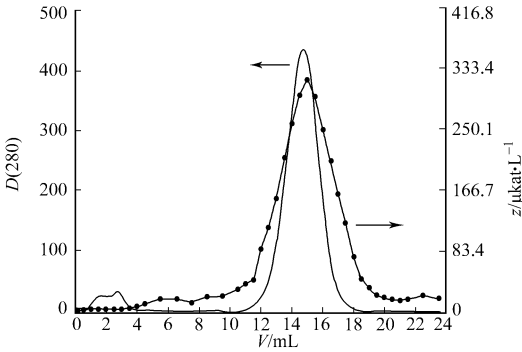


图 3 几丁质酶 C 的 Phenyl Sepharose 层析柱图谱

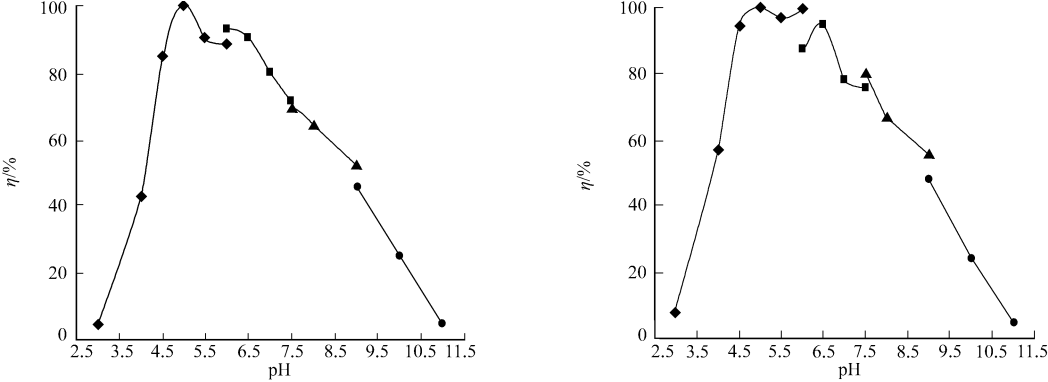
Fig.3 Chromatography of chitinase C on Phenyl Sepharose

2.3 几丁质酶的酶学性质

2.3.1 相对分子质量 经两步纯化得到的几丁质酶 C 的 SDS-PAGE, 结果如图 4(b) 所示. 图 4(b) 中, 泳道 1 为还原状态的几丁质酶 C(即添加了 DTT), 泳道 2 为非还原状态的几丁质酶 C(没有添加 DTT), 泳道 3 为蛋白相对分子质量. 图 4(b) 中, 经凝胶成像系统分析, 泳道 1, 2 显示在还原及非还原状态下的几丁质酶的相对分子质量均为 51.8 ku, 表明纯化得到的几丁质酶为单体蛋白.

2.3.2 最适反应 pH 值及 pH 值稳定性 分别以 0.1 mol · L⁻¹ 柠檬酸钠缓冲液(pH 值为 3.0~ 6.0), 0.1 mol · L⁻¹ Mcllvaine's 缓冲液(pH 值为 6.0~ 7.5), 0.1 mol · L⁻¹ Tris-H Cl(pH 值为 7.5~ 9.0), 0.1 mol · L⁻¹ NaHCO₃-KOH 缓冲液(pH 值为 9~ 11) 配制底物. 经纯化的几丁质酶在不同 pH 值(3.0~ 11.0) 下进行酶促反应以测定酶活力, 结果如图 5(a) 所示. 从图 5(a) 可以看出, 几丁质酶随反应液 pH 值的变化而变化, 其在 pH 值为 4.5~ 7.0 之间, 酶活力较高, 相对酶活力均在 80% 以上; 在 pH 值为 5.0 时, 酶活最高; 而在 pH 值小于 4.5 时, 酶活力迅速下降.

将酶液置于不同 pH 值的缓冲液中 3 h, 然后测定酶活力, 几丁质酶对 pH 稳定性的结果如图 5(b) 所示. 从图 5(b) 可以看出, 几丁质酶在 pH 值为 4.5~ 6.5 之间酶较为稳定, 孵育 3 h 后, 其相对酶活力均保持在 80% 以上. 当 pH 值低于 4.5 或者高于 7 时, 酶活力受到较大影响.



(a) 最适反应 pH 值 (b) pH 值稳定性

图 5 pH 值对几丁质酶 C 酶活力的影响

Fig.5 Effect of pH on chitinase C activity

2.3.3 最适反应温度及温度稳定性 在不同温度下, 进行几丁质酶酶活力的测定, 结果如图 6(a) 所示. 几丁质酶酶活力随温度升高而逐渐增加, 在 45~ 55 ℃之间酶活力较高, 相对酶活力均在 80% 以上; 在 55 ℃时, 酶活力达到最大; 而当温度超过 55 ℃时, 酶活力急剧下降.

将酶液置于 30, 50, 55, 60 ℃的水浴锅中保温 0.5, 1.0, 2.5, 4.0 h 后测定酶活力, 结果如图 6(b) 所示. 从图 6(b) 可知, 几丁质酶酶在 60 ℃时失活较快, 大约 1 h 仅剩 60% 的酶活力; 但在 55 ℃下保温 4 h, 仍具有 90% 以上的酶活力; 在 30, 50 ℃保温条件下, 其酶活力几乎没有下降, 有很好的温度稳定性.

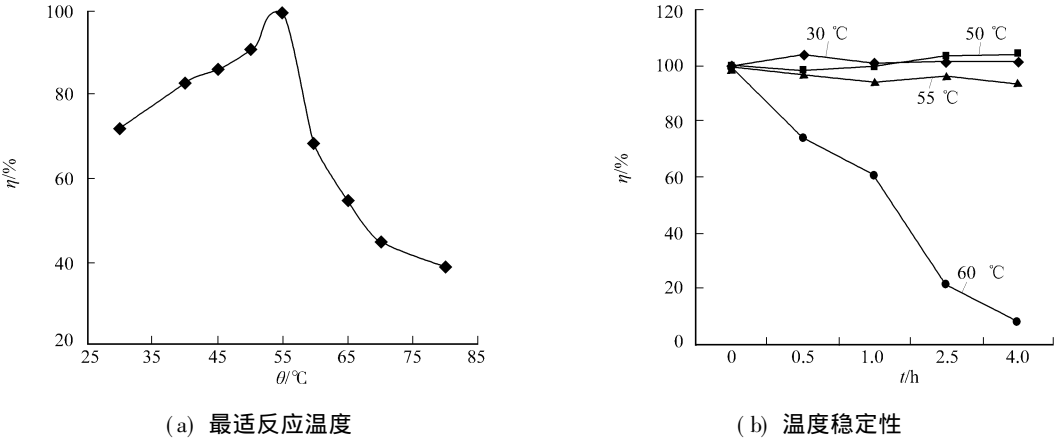


图 6 温度对几丁质酶 C 酶活力的影响

Fig. 6 Effect of temperature on chitinase C activity

2.3.4 金属离子对酶活力的影响 以 McIlvaine's 配制含 20 mmol · L⁻¹ 一价、二价金属离子缓冲液, 使其终浓度为 10 mmol · L⁻¹, 再以该溶液代替酶活力测定时所加的 McIlvaine's 测定酶活力. 以不添加离子的酶样活性(100%) 作为对照, 考察金属离子对酶活力的影响, 结果如图 7 所示. 从图 7 可知, Cu²⁺, Hg²⁺, Co²⁺, Mg²⁺ 对酶活力均有明显抑制作用; Fe²⁺, Zn²⁺, Sn²⁺, Ba²⁺ 对酶活力均有一定促进作用; Mn²⁺ 对酶活力明显促进作用.

3 讨论

采用 Phenyl Sepharose FF (Low Sub) 疏水层析柱分离、纯化几丁质酶 C 当第 1 组分流后, 在未进行洗脱目的蛋白的情况下, 目的蛋白随后会流出, 但 D(280) 曲线上升缓慢. 这可能由于苯基作为取代基的层析柱疏水性仍

不够, 需要换疏水性更强的层析柱才不会使得目的蛋白流出. 纯化得到的几丁质酶 C 相对分子质量约为 51.8 ku, 为单一亚基蛋白质, 同文[3, 5] 得到的几丁质酶 C 相对分子质量大小相近.

由于采取的纯化策略不同, 实验未得到由几丁质酶 C 蛋白水解而来的 ChiC2. 经两步纯化得到的几丁质酶 C, 其最适反应 pH 值为 5.0, 最适反应温度为 55 ℃, 与文[3] 报道的最适反应 pH 值为 5.5 仅相差 0.5 单位, 但与其报道的最适反应温度 45 ℃相比高出 10 ℃^[3]; 与 Suzuki 等^[1] 报道的最适反应 pH 值为 4.5 也相差 0.5 单位, 而最适反应温度却较之低 10 ℃; Synstad 等^[8] 报道的几丁质酶 C 最适反应 pH 值为 4.0.

在诸多报道中, 几丁质酶 C 的最适反应 pH 均偏酸性, Synstad 等^[11] 采用定点突变, 将粘质沙雷氏菌 B JL200-ChiB 215 位点氨基酸突变为天冬酰胺, 使得该酶的最适 pH 值向酸性偏移. 酸性范围内的差异, 可能是由于蛋白序列中个别氨基酸的改变所引起. 不同来源的几丁质酶存在较大的性质差异, 可能与不同菌株所产生酶的性质不同相关, 也可能与分离纯化条件相关^[10].

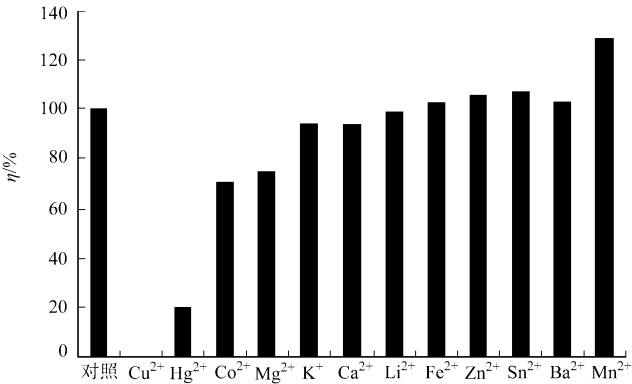


图 7 金属离子对几丁质酶 C 活力的影响

Fig. 7 Effect of metal ions on chitinase C activity

目前, 还没有粘质沙雷氏菌几丁质酶 C 的晶体结构的报道, 粘质沙雷氏菌几丁质酶 C 更多的性质还需要进一步研究.

参考文献:

- [1] SUZUKI K, SUGAWARA N, SUZUKI M, et al. Chitinase A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic properties and synergism on chitin degradation[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(5): 1075-1083.
- [2] BRURBERG M, SYNSTAD B, KLEMSDAL S S, et al. Chitinases from *Serratia marcescens*[EB/OL]. [2000-08-09]. <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/pdf/chirev.pdf>
- [3] GAL S W, CHOI Y J, KIM Y C, et al. Cloning of the 52-kDa chitinase gene from *Serratia marcescens* KCTC2172 and its proteolytic cleavage into an active 35-kDa enzyme[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 160(1): 151-158.
- [4] 魏巍, 贺淹才, 方柏山, 等. 粘质沙雷氏菌几丁质酶(ChiC) 基因克隆及其生物信息学分析[J]. *江西农业大学学报*, 2006, 28(3): 444-448.
- [5] SUZUKI K, TAIYOJI M, SUGAWARA N, et al. The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases[J]. *Biochem J*, 1999, 343(3): 587-596.
- [6] 贺淹才, 刘爱花, 张荣奎, 等. 嗜麦芽窄食单胞菌产生的几丁质酶的特性[J]. *华侨大学学报: 自然科学版*, 2008, 29(2): 245-249.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] SYNSTAD B, VAAJE-KOLSTAD G, CEDERKVIST F, et al. Expression and characterization of endochitinase C from *Serratia marcescens* BJL200 and its purification by a one-step general chitinase purification method[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(3): 715-723.
- [9] TSAFFRIR Z, ZVIL S. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 236(2): 302-308.
- [10] 唐亚雄, 赵建, 丁诗华, 等. 产气肠杆菌几丁质酶的分离纯化及性质研究[J]. *微生物学报*, 2001, 41(1): 82-86.
- [11] SYNSTAD B, GASEIDNES S, AALTEN D M F, et al. Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(2): 253-262.

Purification and Enzyme Properties of Recombinant *Serratia marcescens* Chitinase C

LIU Jia, HE Yan-cai, SHI Teng-xin,
LI Zi-jun, WANG Zhen-zhu

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: To obtain high pure chitinase C from constructed recombinant *E. coli* pET-22b-chiC, we decreased culture temperature to increase soluble expression of *Serratia marcescens* chitinase C. The expressed product was purified to electrophoretic homogeneity by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) and Phenyl-Sepharose hydrophobic interaction chromatography (HIC). The enzyme properties research indicated that the purified chitinase C was a monomeric protein with a molecular weight of 51.8 ku. The optimum pH was 5.0 and the optimum temperature was 55 °C. And its activity still kept above 90% after 1 h at 55 °C. Results also showed that the activity of chitinase was significantly inhibited by Cu^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , while promoted by Fe^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{2+} , Ba^{2+} and also significantly promoted by Mn^{2+} .

Keywords: *Serratia marcescens*; recombinant; chitinase C; isolation and purification; enzyme properties

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)