

脂蛋白酯酶的分离纯化及其部分性质研究

何义国^a, 赵兴秀^b, 邓静^b, 吴华昌^b

(四川理工学院 a. 化学与制药工程学院; b. 生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要:将 *Candida rugosa* 用橄榄油诱导培养, 所得上清液依次经过截留分子量 10 000 中空纤维柱浓缩, 85% 硫酸铵沉淀, 然后经过 DEAE - Sepharose F. F. 离子柱和 Phenyl Sepharose CL - 4B 柱进行交换层析和疏水层析, 得到了活力达 6.04 U/mg 的脂蛋白酯酶, 纯化倍数和回收率分别为 13.8 倍 6.6%。所得纯化酶经还原和非还原 SDS - PAGE 分析为单一蛋白染色带, HPLC 显示纯度为 95% 以上。该酶的最适温度为 40 ℃ ~ 50 ℃ 之间, 最适 pH 为 7.5, 具有较强的热稳定性和酸碱稳定性, 在最适温度和 pH 条件下该酶 K_m 值为 3.4×10^{-4} mol/L。

关键词:脂蛋白酯酶; 假丝酵母; 脂蛋白酯酶性质

中图分类号: TQ920.6

文献标志码: A

近年来, 随着我国居民饮食结构的逐渐改变, 糖尿病、高血压、冠心病、高脂血症、肥胖症和其他富裕性疾病的发病率大幅度提高^[1], 引起了全社会的关注。高脂血症是心脑血管疾病的罪魁祸首, 在中国约 9 000 万人患高脂血症^[2]。因此, 加强血脂水平的监测、早期诊断、定期筛检、预防和治疗已成为降低脑血管疾病中的重要举措^[3]。脂蛋白脂肪酶 (Lipoprotein lipase, 简称 LPL)^[4-5], 是血脂含量检测的重要工具酶, 在临床诊断疾病中用量很大, 但我国却没有生产, 一直依赖于进口^[6], 因此, 增加了病人的医疗费用, 而且严重制约了我国研究这种工具酶试剂盒的步伐。根据脂蛋白酯酶的疏水性较强的性质和酶蛋白的电荷差异, 本文采用近年来发展起来的疏水层析技术^[7]和离子交换层析技术, 首先将发酵液进行浓缩, 然后脱盐处理, 采用 Phenyl Sepharose CL - 4B 疏水层析和 DEAE - Sepharose F. F. 离子交换层析等方法进一步分离纯化, 试验流程操作相对简便, 最终蛋白质产品的纯度达 6.04 U/mg。另外, 本文还对脂蛋白酯酶的部分性质进行了一定的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与培养基

皱褶假丝酵母由 ATCC 提供。

优化培养基 (%) : K_2HPO_4 0.05, 橄榄油 0.6, 酵母膏 0.3, Tween - 80 0.1%, Na_2HPO_4 0.1, 蛋白胨 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, 麦芽浸膏 0.3。

种子培养基 (%) : 葡萄糖 0.1, 蛋白胨 0.5, 酵母浸膏 0.5。

发酵培养基 (%) : 蛋白胨 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 酵母浸膏 0.3, K_2HPO_4 0.05, 橄榄油 0.5。

斜面培养基 (%) : 酵母浸膏 0.5, 蛋白胨 0.5, 琼脂粉 2.0, 葡萄糖 0.1。

1.1.2 主要仪器与试剂

UV - 2102 紫外分光光度计 (美国 UNICO 公司), Waters 600 HPLC (美国 Waters 公司), HD - 2000 紫外检测仪 (上海嘉鹏科技有限公司), 76S/02324 凝胶成像仪 (美国 Bio - Rad 公司), Amersham CFP - 2 - E - 4MA

收稿日期: 2012-09-13

基金项目: 四川省教育厅项目 (11ZD244); 泸州老窖科研奖学金项目 (09ljzk05)

作者简介: 何义国 (1976-), 男, 四川达州人, 实验师, 硕士, 主要从事生物制药方面的研究, (E-mail) 623545277@qq.com

中空纤维柱(上海明睿生物技术有限公司),Bechman J-25 高速冷冻离心机(美国 BECKMAN 公司),HPLC(岛津 LC-2010HT);4-Nitrophenyl palmitate (Sigma),蛋白胨(OXOID),DEAE-Sephrose F.F.(Pharmacia),琼脂粉(日本进口分装),SDS(Amresco),分子量标准蛋白(Promega),Phenyl Sepharose CL-4B(Pharmacia),其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 蛋白浓度测定

以 BSA 为标准蛋白对照,采用 Bradford 法^[8]。

1.2.2 菌种培养及无细胞粗酶液的提取^[9]

Candida rugosa 在斜面培养基上培养 36 h,温度为 28 °C,然后接入种子培养基(100 mL 培养基/250 mL 三角瓶),在 200 r/min 旋转摇床培养 24 h,温度为 28 °C,再按 10% 的接种量接入发酵培养基(100 mL 培养基/250 mL 三角瓶)中,继续培养 27 h。将发酵液进行 4 °C 冷冻离心(12 000 r/min)10 min,上清液即为无细胞粗酶液。

1.2.3 发酵粗酶液的浓缩和初级分离

将离心所得无细胞粗酶液依次使用截留分子量 10 000 和横截口径 0.2 μm 的中空纤维柱进行超滤浓缩,再使用 50 mmol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液交换浓缩粗酶液体系环境,得到浓缩发酵粗酶液,再用 85% 的硫酸铵进行沉淀。

1.2.4 DEAE-Sephrose FF 层析

用 20.0 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)充分平衡层析柱(7.0 cm × 5.0 cm),上样流速为 1.5 mL/min,上样结束后用 0.25 mol/L NaCl 与 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)以流速 4.0 mL/min 洗去杂蛋白,然后以 0.3 mol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱目的蛋白,流速为 2.0 mL/min,以 2.0 mL 进行分步收集,通过检测收集酶活性峰部分。

1.2.5 Phenyl-Sephrose CL-4B 层析

层析柱(7.0 cm × 2.5 cm),用 pH7.5、20.0 mmol/L 含 10% (NH₄)₂SO₄ 的 Tris-HCl 缓冲液充分平衡层析柱,流速 1.5 mL/min。将 DEAE 离子柱层析收集到的酶活性峰部分合并,用超滤器略作浓缩,用含 20% 硫酸铵的 Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)稀释 DEAE 离子层析酶样品至硫酸铵浓度为 10%,再于 4 °C 冷冻离心 10 min (12 000 rpm),上清液上柱,流速为 1.0 mL/min。再用 10 倍体积的含 5% 硫酸铵 Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)洗柱,除去疏水性较弱的蛋白质。用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)洗脱,分部收集,通过检测收集酶活性

峰部分。

1.2.6 SDS-PAGE

在还原和非还原条件下进行电泳。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸(pH8.3),浓缩胶浓度 4%,分离胶浓度 10%,样品含 5 μg 蛋白,电泳起始电压 120 V,样品进入分离胶后电压 180 V,电泳时间 45 min。用考马斯亮蓝 R-250 染色。分子量标准蛋白:14.4 ~ 116.0 kDa (β-牛乳糖酶 116 000 Da,牛血清白蛋白 66 200 Da,卵清蛋白 45 000 Da,乳酸脱氢酶 35 000 Da,限制性核酸内切酶 Bsp981 25 000 Da,β-乳球蛋白 18 400 Da,溶菌酶 14 400 Da)。

1.2.7 HPLC

Waters 600 HPLC 柱,流动相为 50.0 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 280 nm。

1.2.8 酶活性定义及测定方法

在 45 °C、pH7.5 条件下,一分钟内催化生成 1 μmol 对硝基苯酚(PNP)所需酶量为一个活力单位。具体过程:取 0.45 mL PNP-Palmitate 溶液(2.5 mmol/L 4-Nitrophenyl palmitate, pH7.5 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,0.5% Triton X-100),加入酶液 0.05 mL,45 °C 下保温 5 min 后准确反应 15 min,立即加入 1.0 mL Na₂CO₃ 溶液终止酶促反应,立即测量 OD₄₁₀ 吸光度变化值,与先前进行酶变性的相同混合物作空白对照。

1.2.9 最适 pH 和酸碱稳定性的分析

取 0.45 mL 不同 pH 缓冲液配制的 2.5 mmol/L 4-Nitrophenyl palmitate,在 45 °C 时加入 0.05 mL 适当稀释的酶样品,精确反应 15 min 后加 1 mL 0.5 mol/L Na₂CO₃ 终止反应,410 nm 处测定吸光度,得酶活力随 pH 变化的曲线。用 pH 为 4 ~ 10 的各种缓冲液各 0.045 mL 与脂蛋白酯酶水溶液 0.005 mL 25 °C 处理 20 h 后,与用 200 mmol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液配制的底物 PNP-Palmitate 溶液分别于 45 °C 下保温 5 min 后,混合反应 15 min,此时底物溶液将反应体系 pH 调至 7.5。用 1 mL Na₂CO₃ 溶液(浓度 0.5 mol/L)终止反应并测定酶活力,绘制出酸碱稳定性曲线。

1.2.10 最适温度和热稳定性分析

在 pH7.5 时将 0.05 mL 适当稀释的酶液加入到 0.45 mL 不同温度下保温的 2.5 mmol/L 4-Nitrophenyl palmitate 工作液中,精确反应 15 min 后终止,410 nm 处测定酶活性,得酶活力随温度变化的曲线。将脂蛋白酯酶样品 0.05 mL 分别在不同温度(30 °C、40 °C、45 °C、50 °C、60 °C、70 °C 和 80 °C)下精确保温(时间分别为

10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min 和 70 min),然后在冰水浴中迅速冷却。于 45 °C 水浴中预热 5 min,与用 200 mmol/L 的 Tris - HCl 缓冲液 (pH 7.5) 配制的底物 PNP - Palmitate 溶液反应 15 min,用 1 mL Na₂CO₃ 溶液 (浓度 0.5 mol/L) 终止反应并测定酶活力,绘制出热稳定性曲线。

1.2.11 脂蛋白酯酶米氏常数(Km)的测定

在最适 pH 和温度条件下,分别取 0.05 mL 脂蛋白酯酶样品与不同浓度(62.5 μmol/L ~ 250 μmol/L) PNP - Palmitate 溶液,在 410 nm 处连续测定 1min 内光吸收的减少量,取初速度线性速率作为相对反应速度 v,将测定结果换算成 1/[S] 和 1/v,根据 Lineweaver Burk 双倒数作图法,用 1/v 对 1/[S] 作图。

2 结果与分析

2.1 脂蛋白酯酶的分离纯化

发酵培养收集上清液,通过中空纤维分流及浓缩、85% 硫酸铵沉淀(图 1),DEAE - Sepharose F. F. 凝胶层析(图 2)和 Phenyl Sepharose CL - 4B 凝胶层析(图 3)即可以得到电泳纯的样品,整个纯化情况见表 1。

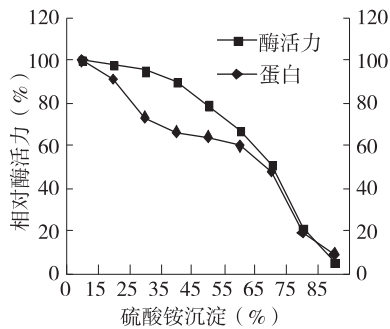


图 1 硫酸铵沉淀曲线

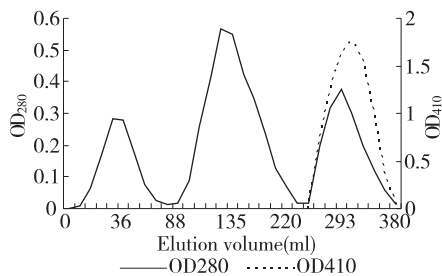


图 2 DEAE - Sepharose F. F. 层析图

图 3 所得纯品经 SDS - PAGE (还原/非还原条件下)鉴定均为单一染色条带(图 4),说明该脂蛋白酯酶为单链蛋白,不存在多亚基。通过 HPLC 分析为单一蛋白洗脱峰(图 5),峰面积积分表明该酶纯度达 95%,最终纯化的脂蛋白酯酶纯化倍数达 13.8,收率 6.6%。

表 1 皱褶假丝酵母(Candida rugosa) 脂蛋白酯酶纯化结果

步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (U)	相对活性 (U/mg)	纯化倍数	回收率 (%)
粗酶液	805	310	0.385	1.0	100
超滤浓缩	596	261	0.438	1.14	84.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	260	162	0.624	1.62	52.3
DEAE - Sepharose F. F.	31	49	1.59	4.13	15.8
Phenyl Sepharose CL - 4B.	3.4	20.5	6.04	13.8	6.6

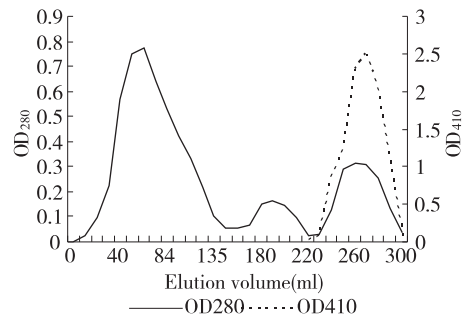
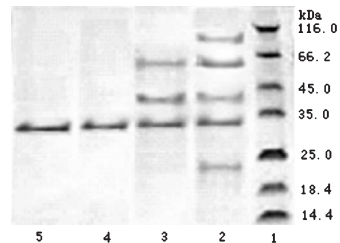


图 3 Phenyl Sepharose CL - 4B 层析图



1: 标准品; 2: 硫酸铵沉淀样品 3: DEAE - Sepharose F. F. 层析样品; 4: Phenyl Sepharose CL - 4B 还原样品; 5: Sepharose CL - 4B 非还原样品

图 4 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

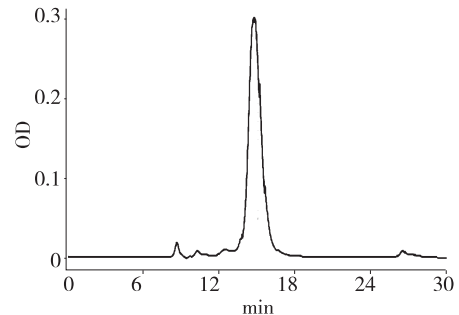


图 5 脂蛋白酯酶 HPLC 纯度鉴定

2.2 酶学性质研究

2.2.1 脂蛋白酯酶的 pH 活性和酸碱稳定性和温度活性

从图 6 可以看出,脂蛋白酯酶的最适 pH 为 8.5;从图 7 可以得出,该酶在 pH7.0 以上均具有较好活性。

2.2.2 脂蛋白酯酶的温度活性和热稳定性

由图 8 可以看出,脂蛋白酯酶的活性必须在一定的

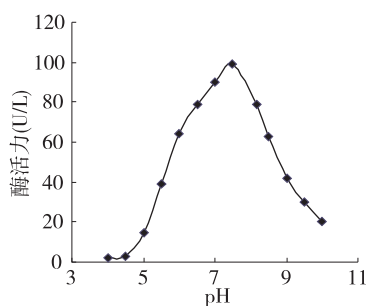


图6 pH对脂蛋白酶活性的影响

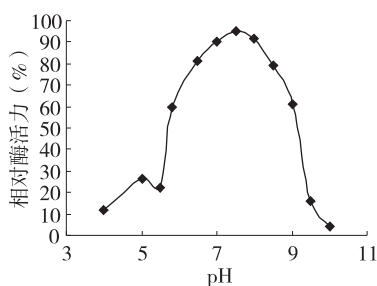


图7 pH对脂蛋白酶稳定性的影响

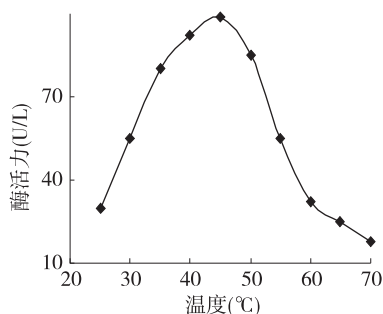


图8 温度对脂蛋白酶活性的影响

温度范围,在40~50℃活性最高,当温度为60℃是仍保持90%的活性,但65℃下保温20min后活性丧失50%以上。从图9可知,脂蛋白酶在40℃条件下稳定性最高,40℃保持60min酶活性几乎没有降低。在最适温度45℃和30℃下保温60min后酶活力均有一定程度的下降。当温度升高到80℃,30min后酶活性就全部丧失。

2.2.3 脂蛋白酯酶的 K_m 值

以4-Nitrophenyl palmitate为底物,在pH7.5、温度45℃最适条件下,按Lineweaver-Burk法作图,根据 $1/v$ 与 $1/[S]$ 的关系曲线,求得脂蛋白酯酶的 K_m 值为 $3.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ (图10)。

3 结束语

本试验通过发酵菌种,对酶液进行分离浓缩,采用DEAE-Sephacrose FF和Phenyl-Sephacrose CL-4B层

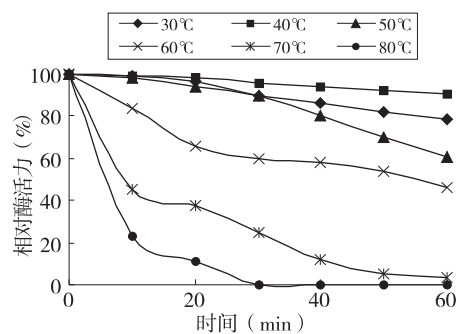


图9 温度对脂蛋白酶稳定性的影响

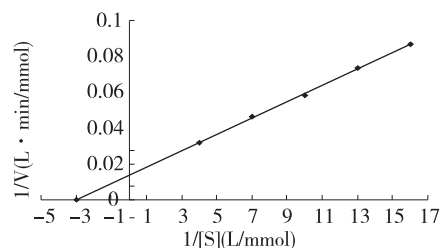


图10 脂蛋白酯酶的Lineweaver-Burk曲线

析,最终得到较纯样品脂蛋白酶,该样品经SDS-PAGE(还原/非还原条件下)鉴定均为单一染色条带,说明该脂蛋白酶为单链蛋白,不存在多亚基。通过HPLC分析为单一蛋白洗脱峰,峰面积积分表明该酶纯度达95%,最终纯化的脂蛋白酶纯化倍数达13.8,收率6.6%。

本试验还对脂蛋白酶的部分性质进行了研究,结果表明:该酶的最适pH为8.5,在pH7.0以上均具有较好活性;该酶的最适温度在40~50℃之间,在低于60℃下仍能保持90%的活性,65℃下保温20min后活性丧失50%以上。该酶在40℃具有很高的稳定性,40℃保持60min酶活性几乎没有降低。当温度从60℃增加到80℃,酶活性逐渐丧失。还通过Lineweaver-Burk法作图得出该酶的 K_m 值为 $3.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

鉴于脂蛋白酯酶的广阔的医药前景,脂蛋白酯酶的研究已经成了国外的研究热点,但我国在这方面起步较晚,目前,国内只有几家单位在做这方面的工作,但也仅限于较为初步的分离纯化研究,国外已有关于脂蛋白酶克隆、表达研究,为大规模生产提供了可能性。在本方法中,采用了特异性高的DEAE-Sephacrose FF和Phenyl-Sephacrose CL-4B层析技术,使脂蛋白酯酶的分离纯化效率和纯度都大为提高,而且得到了该酶的部分酶学性质,为下游工作提供了良好的基础,目前可以对脂蛋白酶进行氨基酸序列及结构分析,通过分析结果可以进行基因克隆表达,为大量生产脂蛋白酶提供

可能。当前,通过本方法分离到的脂蛋白酯酶可用于血脂浓度诊断试剂盒的配制,或 PEG 修饰后用作药物治疗某些疾病。

参 考 文 献:

- [1] 刘晓辉.辛伐他汀与普伐他汀对 2 型糖尿病患者血脂及 C-反应蛋白的影响[J].湖南中医药大学学报,2011,12(3):43-44.
- [2] 张利华.绞股蓝对高脂血症患者 C 反应蛋白水平的影响[J].中国医药科学,2011,22(13):91-92.
- [3] Masera G,Jankovic M,Zurlo M G,et al.Characterization and purification of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*[J].J Pediatric,1982,13(100):152-155.
- [4] Kralova B.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J].Biotechnol less,1986,8(2):99-102.
- [5] Paolo Montalbini,Miguel Aguilar,Manuel Pineda.High-sensitivity sequence analysis of protein recovered from sodium dodecyl sulfate gel[J].Plant Science,1999(147):139-147.
- [6] 赵兴秀,何义国,方春玉,等.皱褶假丝酵母产脂蛋白酯酶的发酵条件优化及性质研究[J].中国酿造,2010,11(3):66-69.
- [7] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2009.
- [8] Bradford M W.Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis*(Coleoptera,Chrysomelidae)[J].Anal Biochem,1976(72):248-254.
- [9] 岑沛霖,蔡谨.工业微生物学[M].北京:化学工业出版社,2000.

Study on Purification and Characterization of Lipoprotein Lipase From *Candida Rugosa*

HE Yi-guo^a, ZHAO Xing-xiu^b, DENG Jing^b, WU Hua-chang^b

(a. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering; b. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: *Candida rugosa* is cultivated with inducement of substrate including olive oil. The obtained supernatant is treated by the ways of hollow fiber concentration (10,000cut M. W.) and 85% (NH₄)SO₄, then the crude lipoprotein lipase is purified by DEAE-Sepharose F. F. chromatography and Phenyl Sepharose CL-4B chromatography. The pure enzyme is obtained which reaches 6.04U/mg, and the yield of enzyme activity is 6.6% with a 13.8-fold purification factor. The purified lipoprotein lipase is a single protein band detected by reduced / non-reduced SDS-PAGE. The purity is above 95% analyzed by HPLC. The enzyme is found to have good pH stability and thermal stability, the optimum pH is 7.5 and the optimum temperature is 40°C ~50°C. The Km of purified lipoprotein lipase is 3.4 × 10⁻⁴ mol/L at the optimum temperature and pH.

Key words: lipoprotein lipase; *Candida rugosa*; characterization of lipoprotein lipase