

文章编号 :1009-038X(2000)01-0009-05

## 碱性脂肪酶同工酶的分离纯化\*

邬敏辰<sup>1</sup>, 黄伟达<sup>1</sup>, 孙崇荣<sup>1</sup>, 邬显章<sup>2</sup>

(1. 复旦大学生物化学系, 上海 200433; 2. 无锡轻工大学中央研究所, 江苏无锡 214036)

**摘要:**对经疏水层析(Phenyl Sepharose CL-4L)和阴离子交换层析(DEAE-Fast Flow)等部分纯化的样品,采用制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步将其分离纯化,获得了 PG37 碱性脂肪酶的 3 种同工酶 Lipase I、Lipase II 和 Lipase III。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Sephadex G-150 凝胶色谱法分别测得同工酶的相对分子质量为 27 500 和 29 000。测定了 Lipase I 的等电点为 5.4,动力学常数  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 4.54 g/dL 和 5.56  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\mu\text{g})$ 。

**关键词:**碱性脂肪酶;分离纯化;同工酶;酶动力学

**中图分类号:** Q556 **文献标识码:** A

### Purification of Isoenzymes from PG37 Alkaline Lipase

WU Min-chen<sup>1</sup>, HUANG Wei-da<sup>1</sup>, SUN Chong-rong<sup>1</sup>, WU Xian-zhang<sup>2</sup>

(1. Department of Biochemistry, Fudan University, Shanghai 200433; 2. Central Research Institute, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract:** Partial purified lipase sample by Phenyl Sepharose CL-4B and DEAE-Fast Flow from PG37 was separated further by preparative polyacrylamide gel electrophoresis. Three isoenzymes (Lipase I, II and III) bands were obtained and had same molecular weight of 27 500 determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis or 29 000 by Sephadex G-150 gel filtration. These results indicated that lipase functions as a monomer, and three isoenzymes had identical molecule and exists some difference in electric charge or glycosylation. The Lipase I showed isoelectric point at pH 5.4. The  $K_m$  and  $V_{max}$  of the lipase I were 4.54 g/dL and 5.56  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\mu\text{g})$  respectively, as determined by Lineweaver-Burk plot.

**Key words:** alkaline lipase; purification; isoenzyme; kinetics of enzyme

近几十年来,已分离提纯了哺乳动物<sup>[1,2]</sup>、细菌<sup>[3,4]</sup>、真菌<sup>[5]</sup>和植物<sup>[6]</sup>等不同来源的脂肪酶,并对纯化酶的相对分子质量、氨基酸组成、金属结合能力、糖苷和磷含量及底物的专一性进行了测定和研

究,从氨基酸或核苷酸的排列顺序确定了多种脂肪酶的一级结构,到目前为止,在已确定序列的脂肪酶中,都包含了 Gly-X-Ser-X-Gly 序列(X:表示任意的氨基酸残基)。

\* 收稿日期:1999-05-05;修订日期:1999-11-20.

基金项目:国家“九五”科技攻关项目(96-C03-02-01).

作者简介:邬敏辰(1962年6月生)男,江苏无锡人,植物学博士研究生,高级工程师。

同工酶(Isoenzyme)是指能催化相同的化学反应,但在蛋白质分子的结构、理化性质和免疫性能等方面都存在明显差异的一组酶。1957年,有人用淀粉凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶(LDH),发现血清中的LDH可以分出5条带。作者在对PG37所产碱性脂肪酶的分离纯化中发现,当该酶液纯化到一定程度后,其在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上呈现单一条带,而非变性凝胶电泳却呈现3条带,采用酶蛋白活性条带印迹方法证明了3个条带都具有脂肪酶活性。实验结果确定了PG37所产碱性脂肪酶中存在3种同工酶,它们的相对分子质量相同(酶蛋白条带在SDS-PAGE图谱上位于同一水平位置,在Sephadex G-150层析图中处于同一洗脱峰内),只是所带电荷或糖基化程度的不同。作者选取其中的一个同工酶Lipase I,测定了它的等电点、动力学常数和N末端氨基酸残基。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 碱性脂肪酶样品 *Penicillium cyclopium* PG37菌株所产碱性脂肪酶粗粉<sup>[7]</sup>经疏水层析(Phenyl Sepharose CL-4L)和阴离子交换层析(DEAE-Fast Flow)等部分纯化的溶液,经透析、冷冻离心,取上清液冷冻干燥制得精酶粉。

1.1.2 试剂 丙烯酰胺和N,N-双甲叉丙烯酰胺(Fluka公司),TEMED(Bio-Rad公司),5种标准相对分子质量蛋白质(牛血清蛋白68 000;卵清蛋白45 000;碳酸酐酶30 000; $\beta$ -乳球蛋白,17 500;溶菌酶,14 300)聚乙烯醇(聚合度,1 750 $\pm$ 50),三丁酸甘油酯,橄榄油,维多利亚蓝,两性电解质载体(LKB公司),DNS-Cl,Sephadex G-150,细胞色素c(Sigma公司),蓝色葡聚糖2 000及其它常用化学试剂。

### 1.2 主要仪器

垂直板型电泳系统,圆盘电泳槽,SX-300快速成像仪,高速组织捣碎机,恒温培养箱,脱色摇床,层析缸,紫外分析仪,层析柱(D 1.6 cm $\times$ 60 cm),核酸蛋白检测仪,自动部分收集器等。

### 1.3 实验方法

1.3.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用不连续垂直板状电泳系统,分离胶质量浓度7 g/dL,浓缩胶质量浓度3 g/dL,Tris-HCl缓冲体系,具体操作参见文献[8]。

1.3.2 等电聚焦电泳 参照文献[9]方法,采用管状等电聚焦电泳系统,使用两性电解质载体(pH 3

~8)进行等电聚焦,测定脂肪酶的等电点。

1.3.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳印迹法 将Hofelmann等<sup>[10]</sup>的方法略作改动,用聚丙烯酰胺凝胶电泳替代等电聚焦电泳。

1.3.4 酶相对分子质量的测定 采用SDS-不连续垂直板状电泳系统测定酶蛋白亚基的相对分子质量,分离胶质量浓度15 g/dL,浓缩胶质量浓度3 g/dL,按Laemmli<sup>[11]</sup>的方法进行。采用Sephadex G-150凝胶柱层析系统测定天然酶的相对分子质量,Sephadex G-150层析的具体操作参见文献[12],其主要柱层析条件为:平衡液和洗脱液为0.02 mol/L NaOH-Gly缓冲液(pH 8.6),1.6 cm $\times$ 60 cm层析柱,脂肪酶样品或标准蛋白质混合溶液2 ml作为上样液,洗脱速度0.4 mL/min,每管收集10 mL,整个过程用部分收集器和自动记录仪分别收集样品和记录洗脱曲线。

1.3.5 酶活性测定 参见邬敏辰等<sup>[13]</sup>方法,以橄榄油-聚乙烯醇乳化液为底物,0.05 mol/L,pH 10.0,Gly-NaOH缓冲液。在一定酶反应条件下,每分钟水解产生1微摩尔游离脂肪酸的酶量定义为一个脂肪酶国际单位。

1.3.6 N末端氨基酸残基测定 采用丹磺酰氯(Dansyl chloride)荧光法测定Lipase I的N末端氨基酸残基,具体步骤参见文献[9]。

1.3.7 蛋白质质量浓度测定 采用Lowry<sup>[14]</sup>法测定蛋白质质量浓度。

## 2 实验结果

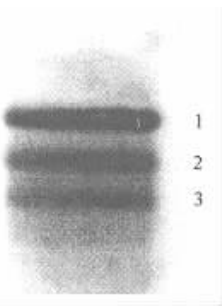
### 2.1 PG37碱性脂肪酶的同工酶分离

精酶粉在聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上呈现3条具有脂肪酶活性的蛋白条带,需进一步分离纯化这3种酶蛋白。取5 mg精酶粉溶于200  $\mu$ L去离子水中,作为凝胶电泳待分离溶液。采用分离胶质量浓度7 g/dL,浓缩胶质量浓度3 g/dL的聚丙烯酰胺凝胶制备型电泳分离纯化样品液,电泳结束后采用活性印迹技术显示脂肪酶各蛋白条带的相对位置,结果见图1。

从图1可见,样品经电泳后在固体琼脂平板上显示出3个分离的酶活性条带,将已分离的条带割下,分别用0.02 mol/L Gly-NaOH缓冲液(pH 8.6)萃取和回收聚丙烯酰胺凝胶中的脂肪酶,从上至下依次称为Lipase I,Lipase II和Lipase III。

### 2.2 3种同工酶的纯度鉴定

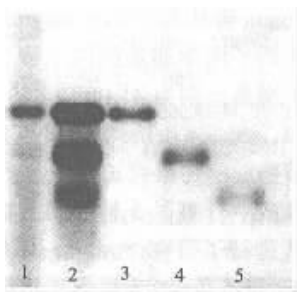
为了鉴定所分离的同工酶纯度,分别将粗酶、精制酶、3种同工酶在同一聚丙烯酰胺凝胶和SDS-



1 Lipase I ; 2 Lipase II ; 3 Lipase III  
图 1 脂肪酶凝胶电泳活性条带印迹图

Fig. 1 Print pattern of active protein bands of lipase in polyacrylamide gel

聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,由图 2 可见,Lipase I, II 和 III 分别在 PAGE 图谱上呈现不同位置单一的蛋白条带(图 3 可见),而 3 种同工酶在 SDS-PAGE 图谱上却呈现同一水平位置单一的蛋白质条带.



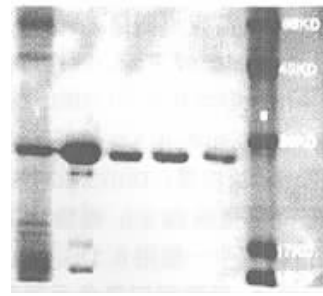
1 粗酶 ; 2 精制酶 ; 3 Lipase I ;  
4 Lipase II ; 5 Lipase III  
图 2 脂肪酶聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 2 The electrophoresis pattern of different lipase isoenzyme on PAGE

2.3 3 种同工酶的相对分子质量测定

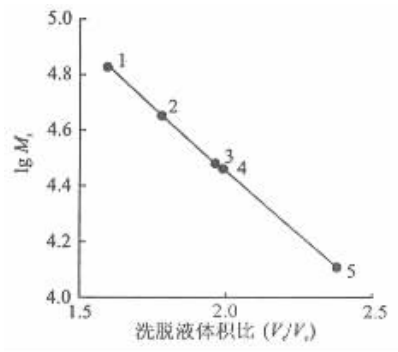
分别用两种不同的方法测定 3 种同工酶的相对分子质量.用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得该 3 种同工酶的相对分子质量都为 27 500,电泳图谱见图 3.另外,将 Lipase I, II 和 III 溶液混合,经 Sephadex G-150 凝胶过滤,洗脱结果呈现一个蛋白峰.经与标准蛋白的洗脱曲线对照,该 3 种同工酶的相对分子质量均为 29 000(图 4).

分析图 2 和图 3 可知,Lipase I、Lipase II 和 Lipase III 虽然在聚丙烯酰胺凝胶电泳中属于不同的 3 个活性条带,但它们在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的条带在同一水平线上,说明该 3 个酶活性组分相对分子质量相同.通过与标准蛋白质的相对分子质量比较和 SX-300 成像仪的计算机处理,测得酶的相对分子质量为 27 500.由于 SDS 凝胶电泳测定的



1 粗酶 ; 2 精制酶 ; 3 Lipase I ;  
4 Lipase II ; 5 Lipase III ; 6 Marker  
图 3 碱性脂肪酶 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 Electrophoresis pattern of alkaline lipase on SDS-PAGE



1 牛血清白蛋白 ; 2 卵清白蛋白  
3 碳酸酐酶 ; 4 Lipase I ; 5 细胞色素 C  
图 4 碱性脂肪酶的凝胶过滤测定结果

Fig. 4 Gel filtration chromatography for evaluation of lipase molecular weight

只是蛋白的亚基或单条肽链的相对分子质量,不一定是天然酶的相对分子质量.所以有可能这 3 个活性组分是酶的不同聚合体形式,从而使它们在 PAGE 和 SDS-PAGE 中呈现上述现象.为了确证是否存在这种可能,作者又采用 Sephadex G-150 凝胶色谱确定了天然酶蛋白相对分子质量为 29 000(图 4)从两种方法测定的酶的相对分子质量可知,该酶以单体形式存在,不存在各种多聚体.以上实验结果可以完全确定 3 个酶活性组分相对分子质量相同,只是所带电荷或糖基化程度不同,推测可能是 PG37 菌株同一产酶基因在蛋白质翻译后处理加工中所引起的各种同工酶性质的差异.Boel 等曾从黑曲霉的 poly(A)<sup>+</sup> RNA 合成了两种 cDNA,并认为它们分别对应于糖化酶同工酶 I 和 II,因两种 cDNA 仅在编码区近 C 端处相差 169 bp,他们提出假设,认为糖化酶 II 的 mRNA 是糖化酶 I 的 mRNA 经转录后加工产生的,即把糖化酶 I mRNA 中 169 bp 的一段作为内含子切割掉生成的.

## 2.4 Lipase I 的等电点测定

分别吸取凝胶贮液 2 mL, 两性电解质载体 0.2 mL, 1% TEMED 溶液 0.7 mL 和 Lipase I 溶液 0.1 mL 混匀, 向胶液加入 0.5% 过硫酸铵溶液 1 mL, 立即装入两支电泳玻管(  $D 0.5 \text{ cm} \times 9.0 \text{ cm}$  )中, 在 160 V 电压下, 等电聚焦 5 h. 电泳结束后取出玻管内的凝胶柱, 将其中一根用 0.1% 考马斯亮蓝染色 4 h, 洗去背景颜色, 量取固定染色后凝胶柱的长度和蛋白质区带中心至正极的距离. 同时, 量取另外一根凝胶柱长度, 再用刀片依次切成 5 mm 长的小段, 用 1 mL 蒸馏水浸泡, 测浸提液的 pH 值, 由于测定的每管凝胶柱浸出液的 pH 值, 都是以 5 mm 长为一小段的 pH 混合平均值, 因此在作图时可以把这个 pH 值视为 5 mm 小段中心区的 pH 值, 于是第一小段的 pH 值所对应的凝胶长度应为 2.5 mm, 依次类推. 以凝胶柱长度对 pH 值作图, 绘制出凝胶柱上的梯度曲线. Lipase I 蛋白区带所对应的 pH 值即为该酶的等电点, 结果见图 5.

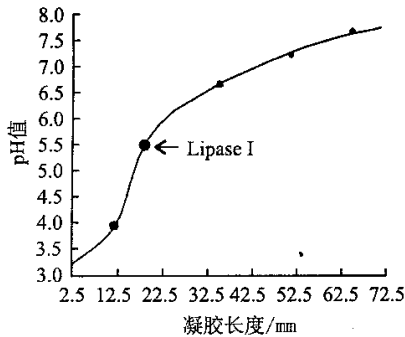


图5 等电聚焦凝胶柱 pH 梯度曲线

Fig. 5 pH gradient curve of isoelectric focusing gel

实验结果表明, 固定前后凝胶柱的长度为 75.0 mm, Lipase I 条带距正极 17.0 mm. 根据固定前后长度, 换算成固定前的距离为 18.2 mm, 直接从 pH 梯度曲线上求出 Lipase I 的等电点为 5.4.

## 2.5 酶动力学常数的确定

取稀释一定倍数的 Lipase I 溶液, 并对溶液中的蛋白质质量浓度作定量测定. 按照底物质量浓度对酶作用的影响规律, 在一系列不同底物质量浓度下测定反应初速度, 再通过双倒数作图可求出  $K_m$  和  $V_{max}$ .

图 6 表示了 Lipase I 对乳化底物进行水解的动力学 Lineweaver-Burk 双倒数图, 由此可知对于橄榄油乳化底物的动力学常数  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 4.54 g/dL 和 5.56  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \mu\text{g})$ . 脂肪酶催化的是简单的水解反应, 但由于底物油脂非水溶性, 对它的动力学研究较为复杂. 但是, 在使用合适的乳

化稳定剂后, 底物乳化系统中油滴直径可以较稳定地保持恒定, 只要初始的油滴直径小到一定程度, 在米氏方程中仍能用底物的浓度计算<sup>[15]</sup>.

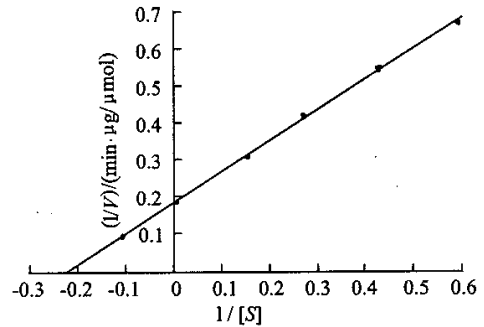


图6 Lipase 的反应动力学双倒数图

Fig. 6 Lineweaver-Burk curve of lipase I

## 3 讨论

Hofelmann 等从黑曲霉(*Asp. niger*)发酵液中分离和纯化到了两个脂肪酶同工酶(I 和 II), 它们的相对分子质量分别为 31 000 和 19 000, 等电点分别为 4.0 和 3.5, 它们的酶学性质也各不相同. 在较早期对真菌脂肪酶的研究工作中, Iwai 等<sup>[18]</sup>从德氏根霉的培养液中分离了 3 种脂肪酶活性成分, 并对它们的性质进行了研究. Antoniar<sup>[17]</sup>进一步采用高压液相层析(凝胶色谱)分离德氏根霉脂肪酶, 发现在 SDS-聚丙烯酰胺双向凝胶电泳上存在 10 种酶蛋白, 它们的分子量均为 38 900, 等电点范围在 4.6~7.0. Huga-Jensen 等<sup>[18]</sup>从 *Rhizomucor miehei* 中分离出两种具有脂肪酶活性的糖蛋白, 它们的糖基化程度不相同. 两种形式酶的氨基酸成分具有类似的氨基酸组成, 该两种形式脂肪酶的 DNA 已被测定, 它们具有相同的一级结构, 即来源于真菌 *Rhizomucor miehei* 的同一脂肪酶基因, 只是以后的蛋白质加工或糖基化作用有所不同, 导致了某些性质的改变. Baillargeon<sup>[19]</sup>对一种 *Geotrichum candium* 商品脂肪酶粗制品进行了提纯, 采用辛基-Sephrose 疏水层析分离纯化的酶是一个微不均一的糖蛋白, 含有各种不同相对分子量、等电点和专一性的同工酶. 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上有 64 000, 62 000 和 59 000 相对分子量序列; 采用等电聚焦检测到等电点分别为 4.40, 4.47, 4.58, 4.67 和 4.72 的 5 个同工酶. 当使用内切糖苷酶 F/N-糖苷酶除去碳水化合物, 同工酶的数目减少到两个(pI 为 4.67 和 4.72). 这些微观不均一的糖蛋白(即各种同工酶)可能是由两个脂肪酶基因编码的. *Penicillium Westring* 产脂肪酶 A 和 B, Iwai 等<sup>[16]</sup>对该

两种脂肪酶分别进行了分离纯化及性质研究, Lipase A 和 Lipase B 的等电点分别为 4.96 和 4.15, 相对分子质量分别为 27 000 和 36 000, 两者对底物的专一性有显著的差别。Aisaka 等<sup>[20]</sup>从 *Rhizopus japonicus* KY521 发酵上清液中采用等电聚焦分离到脂肪酶 I 和 II 两个组分, 其等电点分别 7.4 和 7.9, 两者的相对分子质量均为 42 000。

本研究从 *Penicillium cyclopium* PG37 所产碱性脂肪酶中分离到 3 个同工酶, 其相对分子质量均为 27 500 (SDS-PAGE 测定) 和 29 000 (Sephadex G-

150 凝胶色谱测定), Lipase I 的等电点分别为 5.4, 结合以上讨论中其它研究者的实验结果, 可以推测 PG37 碱性脂肪酶的 3 种同工酶是由同一个脂肪酶基因所编码, 只是在以后的蛋白质后加工中所引起的电荷或糖基化程度的不同, 导致了同工酶之间某些性质的差异, 但进一步证实还有待于糖基含量和 DNA 序列的测定。

致谢 复旦大学生物化学系赵志安教授、王玲娥实验师及本实验室其他研究人员对论文的完成给予了热情支持和帮助, 在此深表谢意。

## 参考文献

- [1] GAVIN D L, AURA S K, MARK C W, et al. Characterization of a purified phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the Papuan black snake[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1250: 137~143
- [2] JOSIANE D C, FRANCINE F, ROBERT V, et al. Purification and molecule characterization of lamb pregastric lipase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1252: 321~329
- [3] LIN S F, CHIOU C M, YEH C M. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-11[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 1093~1095
- [4] YUZO K, MASAOKI Y, TAMIO M. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK 10[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, 58: 1564~1568
- [5] YAMAGUCHI S, MASE T, TAKEUCHI K. Cloning and structure of the mono- and diacylglycerol lipase-encoding gene from *penicillium camembertii* U-15[J]. *Gene*, 1991, 103: 61~67
- [6] HASSANIEN F R, MUKHERJEE K D. Isolation of lipase from Germinating oilseeds for biotechnological processes[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1986, 63: 893~897
- [7] 邬敏辰, 张晓东. 碱性脂肪酶提取的探讨[J]. *江苏食品与发酵*, 1995, 4: 4~8
- [8] 刘毓秀, 程桂芳译. 蛋白质的凝胶电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [9] 陈曾燮, 刘兢, 罗丹编. 生物化学实验[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1994.
- [10] HOFELMANN M, RUTH K E, PETER S. Ultrathin-Layer Agar Gels: A Novel Print Technique for Ultrathin-Layer Isoelectric Focusing of Enzymes[J]. *Anal Biochem*, 1983, 128: 217~222
- [11] Laemmli U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T<sub>4</sub>[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685
- [12] 王重庆, 李云兰, 李德昌等. 高级生物化学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [13] 郑建丰, 邬敏辰. 碱性脂肪酶测定方法的研究[J]. *江苏食品与发酵*, 1996, 4: 811
- [14] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265~275
- [15] 陶文沂. 无锡轻工大学博士论文[D]. 1988
- [16] IWAI M, OKUMURA S, TSUJISAKA Y. The Comparison of the properties of two lipases from *Penicillium cyclopium* Westring[J]. *Agric Biol Chem*, 1975, 39: 1063~1070
- [17] Antonian E. Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases[J]. *Lipids*, 1988, 23: 1101~1106
- [18] HUGE-JENSEN B, GALLUZZO D R, JENSEN R G. Partial Purification and characterization of free and immobilized lipase from *Mucor miehe*[J]. *Lipids*, 1987, 22: 559~565
- [19] BAILLARGEON M W. Purification and specificity of lipases from *Geotrichum candidum*[J]. *Lipids*, 1990, 25: 841~848
- [20] AISAKA K, TERADA O. Purification and properties of lipases from *Rhizopus Japonicus*[J]. *Biochem*, 1981, 89: 817~822

(责任编辑: 朱明)