

3 α -羟类固醇脱氢酶的亲和纯化及化学修饰 提高酶稳定性

方亚男, 段敬霞, 张 玲, 杨海麟*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了 3 α -羟类固醇脱氢酶(3 α -HSD)经化学修饰后的稳定性变化。已构建的基因工程菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET28a-*hsd* 经诱导表达、镍柱亲和纯化得到电泳纯的 3 α -HSD 酶, 酶蛋白得率是 16.5%, 活性回收率为 64.7%, 纯化倍数约为 3.8, 15% SDS-PAGE 结果显示 3 α -HSD 酶为单一条带, 相对分子质量在 28 000 左右。采用邻苯二甲酸酐(PA)作为修饰剂, 对 3 α -HSD 纯酶进行化学修饰, 与对照组相比, 修饰酶抵抗 pH 波动的能力有所增强, 50 °C 水浴 10 min 后酶的热稳定性明显提高, 37 °C 贮藏 40 h 后修饰酶的贮藏稳定性比原酶提高 9 倍。

关键词: 3 α -羟类固醇脱氢酶; 亲和纯化; 邻苯二甲酸酐; 化学修饰; 稳定性

中图分类号: Q 55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)07—0747—05

Affinity Purification of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase and Enzyme Stability Improvement by Chemical Modification

FANG Yanan, DUAN Jingxia, ZHANG Ling, YANG Hailin*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The stability change of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) after chemical modification was studied. The purified 3 α -HSD was obtained by an induced expression of constructed genetic engineering bacteria *E.coli* BL21 (DE3)/pET28a-*hsd* at first and then by an affinity purification using Ni²⁺-Sepharose column with 16.5% of protein yield, 64.5% of recovery yield and 3.8 times of specific activity. The SDS-PAGE (15%, reducing conditions) analysis showed that 3 α -HSD was composed of a single polypeptide of ~28 kDa. The chemical modification of 3 α -HSD was done using phthalic anhydride (PA). After modification, the pH stability of 3 α -HSD increased within pH 6.0~pH 11.0 compared with the control group and its heat stability significantly increased after incubation at 50 °C for 10 min. When stored at 37 °C for 40 h, the storage stability of modified 3 α -HSD was improved about 9-fold than that of native enzyme.

Keywords: 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase, affinity purification, phthalic anhydride, chemical modification, stability

收稿日期: 2015-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31301540; 21306064); 江苏省科技支撑计划项目 (BE2011625); 江苏省自然科学基金项目 (BK2012119)。

* 通信作者: 杨海麟(1971—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 副教授, 主要从事发酵工程和酶工程研究。E-mail: 673179850@qq.com

3 α -羟类固醇脱氢酶 (3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase, 3 α -HSD, EC 1.1.1.50), 可作用于多种类固醇基质, 可逆地催化 C19~27 类固醇 3 位羟基/酮基的氧化还原^[1]。临床上用 3 α -HSD 作为工具酶来测定人血清中的总胆汁酸 (Total bile acids, TBA) 浓度^[2]。目前, TBA 测定中所用的工具酶 3 α -HSD 均从睾酮丛毛单胞菌中直接提取, 但提取过程复杂、酶蛋白得率低, 酶的稳定性低, 在一定程度上限制了 TBA 测定的临床推广^[3]。因此, 要使 3 α -HSD 广泛应用于临床医学中, 一方面需要寻求更简单高效的提取纯化方法, 另一方面必须要提高 3 α -HSD 酶的催化活性、稳定性。

目前, 已有文献报道木瓜蛋白酶、脂肪酶、辣根过氧化物酶 (HRP) 等多种酶经小分子酸酐修饰后, 其催化活性或稳定性得到不同程度的提高^[4-7]。邻苯二甲酸酐是赖氨酸 Lys 的专一修饰剂, PA 的羧基能与 Lys 残基末端的 ϵ -NH₂ 生成酰胺键, 能够有效改善酶的性能。

利用重组菌株 *E.coli* BL21 (DE3)/ pET28a-hsd 表达纯化得到融合蛋白, 采用邻苯二甲酸酐修饰对 3 α -HSD 的 Lys 残基进行化学修饰, 并对 pH 稳定性、热稳定性及贮藏稳定性等进行研究, 并对修饰效果提出合理的解释。

1 材料与方法

1.1 材料

重组菌株 *E.coli* BL21 (DE3)/ pET28a-hsd: 作者所在实验室保藏。邻苯二甲酸酐购自国药化学试剂有限公司; 卡那霉素、异丙基硫代- β -半乳糖苷 (IPTG)、咪唑、牛血清蛋白、透析袋: 均购自上海生工; 所有试剂均是分析纯。

1.2 主要仪器

3K-15 台式高速离心机: SIGMA 公司产品; 754UV 紫外-可见分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司产品; 电热恒温水浴锅: 上海医疗器械五厂制造; 蛋白电泳仪: 美国 BIO-RAD 公司制造。

1.3 实验方法

1.3.1 融合蛋白 3 α -HSD 的表达 菌种发酵培养及融合蛋白 3 α -HSD 的诱导表达见文献^[3]。离心收集细菌沉淀, 超声破碎后离心收集上清液, 即获得粗酶液。

1.3.2 融合蛋白 3 α -HSD 的亲纯化 将 Ni-IDA

琼脂糖作为亲和介质装柱后, 用软管与紫外检测仪相连, 先用平衡缓冲液 (20 mmol/L, pH 7.5 磷酸盐缓冲液) 以 1 mL/min 的流速平衡, 将 30 mL 的粗酶液上样, 平衡缓冲液流洗至 A_{280 nm} 处的吸光值不再变化, 用 100、200、300、400 mmol/L 不同浓度的咪唑进行洗脱, 收集有酶活性的洗脱液, 脱盐后制样品进行质量分数 15% SDS-PAGE 电泳分离, 检测融合蛋白的纯度^[8-9]。

1.3.3 酶活性的测定 按 Boyer 等人的方法测定酶活性^[1]。

1.3.4 蛋白质浓度的测定 采用 Bradford 法进行蛋白质浓度的测定, 以牛血清蛋白为标准蛋白质^[10]。

1.3.5 3 α -HSD 酶的化学修饰 取 10 mL, 10 mmol/L 预先配制好的邻苯二甲酸酐溶液, 与 10 mL, 1 mg/mL 3 α -HSD 酶混合, 在 4 °C 下恒温磁力搅拌 1 h, 反应结束后, 将反应液转入预先处理好的透析袋中, 在 4 °C 下, 用 20 mmol/L pH 7.5 的磷酸缓冲液透析若干小时, 以除去未参加反应的修饰剂^[6]。

1.3.6 酶稳定性测定 将修饰酶和原酶分别与不同 pH 范围 6.0~11.0 磷酸缓冲液混合, 25 °C 水浴 30 min。将修饰酶和原酶分别在 25、30、35、40、45、50、55、60 °C 水浴中保温 10 min 后测酶活。同时将修饰酶和原酶分别在 37 °C 水浴中放置 40 h, 每隔一段时间取样, 按 1.3.3 方法测酶活, 计算相对残余酶活。以上每个样品的稳定性测定均做 3 次平行试验取平均值, 并计算相对残余酶活^[11]。

2 结果与讨论

2.1 融合蛋白 3 α -HSD 的亲纯化

pET28a 作为载体所表达的重组蛋白在其 N 端有一个 6 个 His 组成的“标签”。故利用 Ni²⁺-IDA 琼脂糖作为亲和介质, 组氨酸与 Ni²⁺ 之间形成配位相互作用, 选择性地使融合蛋白 3 α -HSD 吸附在镍柱上, 再用 0.1~0.4 mol/L 不同浓度咪唑进行洗脱, 最终分离纯化出 3 α -HSD 纯酶。

将 Ni-IDA 琼脂糖作为亲和介质装柱, 平衡缓冲液平衡柱床, 粗酶液上样后平衡缓冲液流洗至 A₂₈₀ 处吸光值为定值。用 100、200、300、400 mmol/L 不同浓度咪唑进行洗脱, 蛋白洗脱曲线如图 1 所示。在 0~50 min 时间内, 大部分杂蛋白没有吸附到亲和层析柱上, 其他杂蛋白在 51~90 min 时间段随着低浓度咪唑的洗脱而被分离出来, 而含有酶活的

3 α -HSD 酶在 90~104 min 内被 300 mmol/L 浓度的咪唑洗脱下来。

收集 3 α -HSD 纯化过程中的洗脱峰,测定 3 α -HSD 酶活力及蛋白含量,计算比酶活及蛋白回收率,结果如表 1 所示;亲和纯化后 3 α -HSD 酶蛋白得率是 16.5%,活性回收率为 64.7%,纯化倍数约为 3.8。

取适量粗酶液经镍柱纯化后,将收集到纯酶制备样品,考马斯亮蓝染色后,进行质量分数 15% SDS-PAGE 凝胶电泳,结果如图 2 所示。从图中可以看出,300 mmol/L 咪唑洗脱下来的 3 α -HSD 为单一条带,相对分子质量在 28 000 左右,与文献^[8]中报道一致。

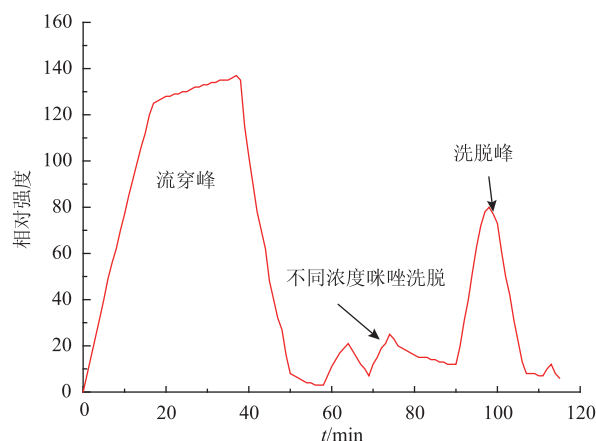
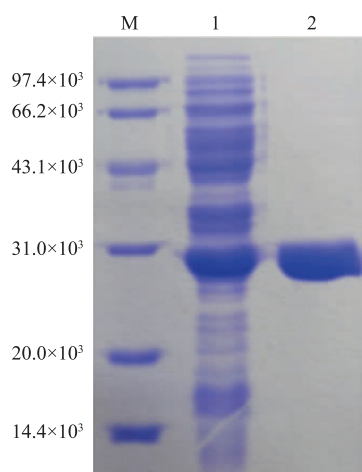


图 1 3 α -HSD 酶的亲和纯化洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of affinity purification of 3 α -HSD



M: 蛋白 Marker; 1: 粗酶液; 2: 纯酶。

图 2 纯酶的质量分数 15% SDS-PAGE 分析

Fig. 2 15% SDS-PAGE analysis of purified 3 α -HSD

表 1 3 α -HSD 酶的分离纯化结果

Table 1 Purification results of 3 α -HSD

类别	总蛋白 质/mg	蛋白得 率/%	总活力/ U	比活力/ (U/mg)	回收率/ %
粗酶液	30.2	100	31.4	1.03	100
镍柱纯化	5.1	16.5	20.1	3.8	64.7

2.2 原酶与修饰酶的 pH 稳定性比较

通常,酶分子经过小分子化学修饰后,其耐酸耐碱能力会发生变化。图 3 显示化学修饰对 3 α -HSD 的 pH 稳定性影响。与原酶相比较,修饰酶对 pH 波动表现了更好的抵抗能力。在 pH=6 和 pH=7 时,原酶的相对残余酶活低于 20%,而在 pH 6.0~11.0 的范围内,修饰酶的相对残余酶活都大于 50%。3 α -HSD 经邻苯二甲酸酐修饰后 pH 稳定性得到一定提高。

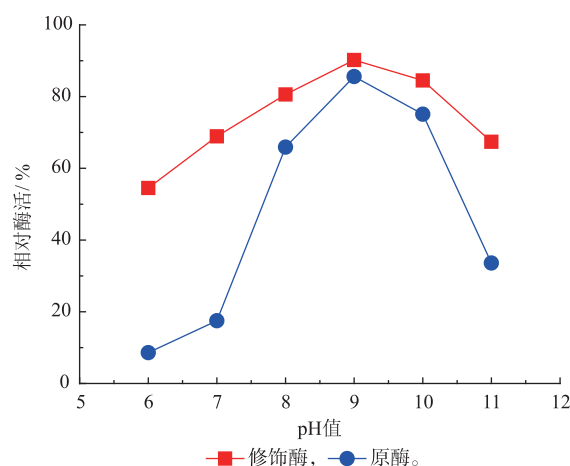
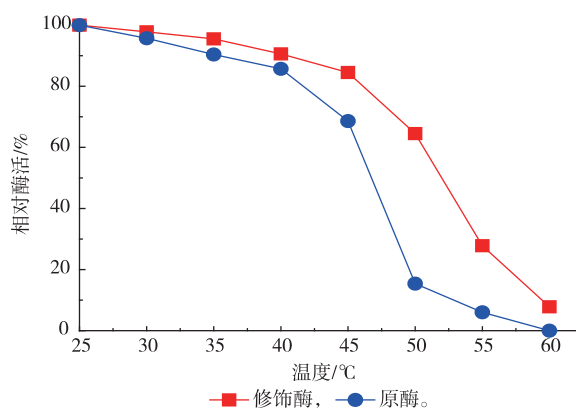


图 3 3 α -HSD 原酶与修饰酶的 pH 稳定性比较

Fig. 3 pH stability comparison of native and PA modified 3 α -HSD

2.3 原酶与修饰酶的热稳定性比较

由图 4 可知,在温度超过 45 $^{\circ}\text{C}$ 时,修饰酶与原酶的相对残余酶活显著的降低。50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 后,原酶的相对残余酶活仅仅 15.4%,而修饰酶的相对酶活值高达 64.5%。60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 后,原酶完全失活,修饰酶有少量酶活。这与其他研究者报道的结果一致。如刘建忠^[6]等人用邻苯二甲酸酐修饰辣根过氧化物酶(HRP)后热稳定性比原酶提高 10 倍。全艳军^[11]等人曾用 EDC 活化后的聚赖氨酸修饰肌氨酸氧化酶表面的羧基,能有效的提高该酶的热稳定性。

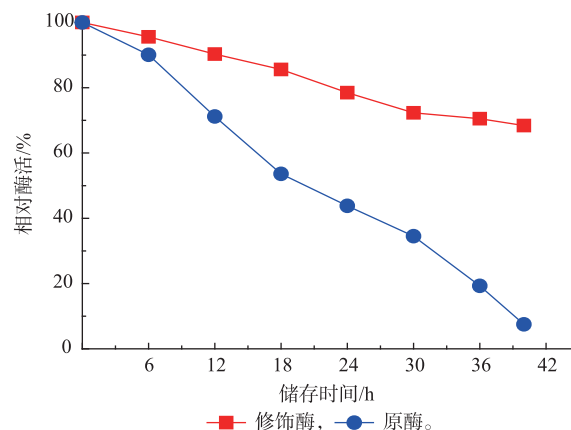
图4 3 α -HSD 原酶与修饰酶的热稳定性比较Fig. 4 Thermal stability comparison of native and PA modified 3 α -HSD

2.4 原酶与修饰酶的贮藏稳定性比较

原酶与修饰酶在 37 °C 水浴中放置 40 h, 每隔一定时间取样测酶活。由图 5 可知, 随着时间的延长, 酶的活性呈下降趋势, 但与原酶相比, 修饰酶的酶活降低幅度小。当放置 40 h 时, 修饰酶的酶活约是原酶酶活的 9 倍。

经邻苯二甲酸酐修饰后, 3 α -HSD 的 pH 稳定性、热稳定性及贮藏稳定性得到不同程度的提高。这种现象可能是: 邻苯二甲酸酐与酶表面赖氨酸 Lys 的氨基反应生成稳定的酰胺键, 中和部分 3 α -HSD 酶表面的电荷, 使酶在水溶液中的稳定性提高。同时, 中和部分电荷也减少酶分子内同种电荷间的排斥, 使得酶分子形成更紧密的结构, 对酶在酸碱条件下的稳定性有积极作用^[12-13]。关于化学修饰提高酶稳定性的原因, 也可能是酶分子与修饰剂

之间共价连接后, 使酶分子结构产生一定的“刚性”, 而变得更加有序和致密, 从而提高酶的稳定性^[14]。

图5 3 α -HSD 原酶与修饰酶的贮藏稳定性比较Fig. 5 Storage stability comparison of native and PA modified 3 α -HSD

3 结 语

重组菌株发酵培养、诱导表达后, 镍柱亲和纯化分离得到 3 α -HSD 纯酶。酶蛋白得率是 16.5%, 活性回收率为 64.7%, 纯化倍数约为 3.8。采用邻苯二甲酸酐对纯酶进行化学修饰, 稳定性试验结果表明, 酶的 pH 稳定性、热稳定性及贮藏稳定性得到不同程度的提高。如修饰酶对 pH 波动表现了更好的抵抗能力。由此可见, 邻苯二甲酸酐修饰是改善 3 α -HSD 酶性质的一种温和、有效的方法。改善的酶学性质对 3 α -HSD 酶在医药、环保等行业的应用有一定的促进作用。

参考文献:

- [1] BOYER J, BARON D N, TALALY P. Purification and properties of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*[J]. *Biochemistry*, 1965, 4(19): 1825-1833.
- [2] 张国华, 丛爱日, 徐国宾, 等. 3 α - 羟类固醇脱氢酶的表达、纯化和酶学性质研究[J]. *微生物学报*, 2004, 44(4): 496-499.
ZHONG Guohua, CONG Airi, XU GuoBin, et al. Overexpression, purification and characterization of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in *Escherichia coli*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(4): 496-499. (in Chinese)
- [3] 张国华, 徐国宾, 刘英民, 等. 睾酮从毛单胞菌 3 α - 羟类固醇脱氢酶基因的质粒载体构建及表达[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(6): 966-969.
ZhANG Guohua, XU Guobin, LIU Yingmin, et al. Construction and overexpression of the plasmid vector of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*[J]. *Prog Biochem and biophys*, 2002, 29(6): 966-969. (in Chinese)
- [4] 宋海燕, 尹友谊. 邻苯二甲酸酐化学修饰对辣根过氧化物酶催化活性的影响[J]. *分子催化*, 2009, 23(5): 465-469.
SONG Haiyan, YIN Youyi. Effects of phthalic anhydride modification on horseradish peroxidase properties [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 23(5): 465-469. (in Chinese)

- [5] HASSANI L. Chemical modification of horseradish peroxidase with carboxylic anhydrides: Effect of negative charge and hydrophilicity of the modifiers on thermal stability[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2012, 80: 15-19.
- [6] LIU J Z, SONG H Y, WENG L P, et al. Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2002, 18: 225-232.
- [7] 张静, 田亚平. 丁二酸酐修饰对枯草芽孢杆菌氨肽酶结构及酶学特性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(6): 622-627.
ZHANG Jing, TIAN Yaping. Chemical modification of the *Bacillus subtilis* aminopeptidase by succinic anhydride and its enzyme properties[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(6): 622-627. (in Chinese)
- [8] MASTER E, XIONG G M. Functional expression, purification and characterization of 3 α -hydroxy-steroid dehydrogenase/carbonyl reductase from Comamonas testosteroni[J]. **Biochemical and Biophysical research communications**, 2000, 272: 622-628.
- [9] 王亚, 崔文璟, 周丽, 等. 粘质沙雷氏菌马来酸顺反异构酶表达纯化及酶学性质 [J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(11): 1204-1209
WANG Ya, CUI Wenjing, ZHOU Li, et al. Purification and characterization of maleate cis-trans isomerase from *Serratia marcescens*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(11): 1204-1209. (in Chinese)
- [10] BRAFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72: 248-254.
- [11] TONG Y J, XIN Y, YANG H L, et al. Efficient improvement on stability of sarcosine oxidase via poly-lysine modification on enzyme surface[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2014, 67: 140-146.
- [12] SONG H Y, YAO J H, LIU J Z, et al. Effects of phthalic anhydride modification on horseradish peroxidase stability and structure [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005, 36: 605-611.
- [13] XUE Y, WU C Y, NING X, et al. Chemical modification of stem bromelain with anhydride groups to enhance its stability and catalytic activity[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2010, 63(3-4): 188-193.
- [14] VILLALONGA R, TACHIBANA S, ASNA Y, et al. Increased conformational and thermal stability properties for phenylalanine dehydrogenase by chemical glycosidation with end-group activated dextran [J]. **Biotechnology Letters**, 2005, 27(17): 1311-1317.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第十三届国际工业微生物遗传学大会

会议名称(英文): 13th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM2016)

所属学科: 动植物微生物学、生物物理学、生物化学及分子生物学、遗传与发育生物学

开始日期: 2016-10-16 结束日期: 2016-10-20

所在城市: 湖北省 武汉市

具体地点: 武汉东湖国际会议中心

主办单位: 武汉大学、中国科学院上海生物工程研究中心

会议主席: 邓子新 武汉大学、武汉生物技术研究院

摘要截稿日期: 2016-06-01

E-MAIL: GIM2016@163.com

会议网站: <http://gim2016.cn>

会议背景介绍: 第十三届国际工业微生物遗传学大会(GIM2016)将于2016年10月16-20日在武汉东湖国际会议中心举行,我非常荣幸地代表大会组委会诚挚邀请您参加此次国际盛会。

本届大会将为全世界微生物遗传学领域的科研工作者们提供一个促进交流、加强合作的高端平台,我们也为所有与会者精心安排了涵盖微生物遗传基础研究与应用研究前沿的主题分会以及墙报展示。我们真诚地邀请相关领域的国内外专家学者在此汇聚一堂,展示您的最新科研成果;我们也热烈地欢迎企业负责人和商务代表的到来,为微生物科学成果的商业转化献策献力,为本次大会的顺利举办提供支持。