

Ni²⁺螯合的琼脂糖凝胶载体用于重组酶 SUMO-Hep I-His 的固定化

张轩月¹, 程咏梅², 宋志新³, 张华³, 陈敬华^{*1}

(1. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 无锡贝迪生物工程股份有限公司, 江苏 无锡 214092; 3. 常州生化药业(江苏)有限公司, 江苏 常州 213000)

摘要: 以 Ni²⁺螯合的琼脂糖凝胶 (GLK-Gel Ni) 作为固定化载体, 对融合肝素酶 Sumo-Hep I-His 的固定化进行了研究, 实现了融合酶的一步纯化和固定化。通过对固定化条件的优化, 得到较优的固定化体系: 载体与粗酶质量比为 30:1, 固定化 pH 为 7.0, 吸附时间为 6 h, 该条件下获得的固定化酶酶活 10.07±0.35 IU/mL 载体。酶学性质研究结果表明: 固定化酶在 30 °C 的热稳定性相对于游离酶显著提高, 固定化酶半衰期是游离酶的 8 倍, 最适反应温度提高了 3 °C, 反应 pH 的耐受性也有了明显的提高。此外, 与游离酶相比, 固定化酶的储藏稳定性和可重复利用性良好, 在 4 °C 下放置 60 d 能保持 76% 的初始活性; 固定化酶重复使用 8 次后, 酶活仍剩余 75.8%; 而且 GLK-Gel Ni 载体本身具有良好的重复利用性, 重复固定 5 次 Sumo-Hep I-His 后, 载体对酶的活性吸附仍能达到 88.9%。整体而言, 固定化 Sumo-Hep I-His 显现了较好的工业应用潜能。

关键词: 肝素酶 I; GLK-Gel Ni; 固定化; 酶活

中图分类号: Q 814.2 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)08-0824-06

Immobilization of an Sumo-Heparinase I-His Fusion Enzyme on Ni²⁺ Chelating Agarose Gel Carrier

ZHANG Xuanyue¹, CHENG Yongmei², SONG Zhixin³, ZHANG Hua³, CHEN Jinghua^{*1}

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Biot Biology Technology Co., Ltd, Wuxi 214192, China; 3. Changshan Biochem Pharm (Jiangsu) Co., Ltd, Changzhou 213000, China)

Abstract: In this study, immobilization of Sumo-Hep I-His was investigated using Ni²⁺ chelating agarose gel as carrier. Under optimal conditions, i.e., weight ratio of carrier to crude enzyme 30:1, pH 7.0 and immobilized time 6 h, Sumo-Hep I-His was successfully immobilized with an apparent enzymatic activity of 10.07 ± 0.35 IU/mL carrier. Compared with free enzyme, immobilized Sumo-Hep I-His showed great improvement in thermo stability (the half-life was 8 times of free Hep I at 30 °C as well as pH stability). The storage and operation stability of the immobilized enzyme was

收稿日期: 2015-10-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(21306066)。

* 通信作者: 陈敬华(1971—), 男, 湖北大冶人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物大分子和生物功能材料的研究。

E-mail: jhchenwhut@126.com

引用本文: 张轩月, 程咏梅, 宋志新, 等. Ni²⁺螯合的琼脂糖凝胶载体用于重组酶 SUMO-Hep I-His 的固定化[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(08): 824-829.

also significantly improved, as 76% relative enzymatic activity was remained after storing for 60 days at 4 °C and 75.8% relative enzymatic activity was remained after 8 reaction cycles. GLK-Gel Ni gel also showed good recycling stability that 88.9% adsorptive capacity was remained after 5 cycles immobilization. Conclusively, immobilized Hep I showed great potential in industrial application.

Keywords: Hep I, GLK-Gel Ni, immobilization, enzyme activity

肝素酶(Heparanase, Hep)是一类多糖裂解酶,作用于肝素或者硫酸乙酰肝素的多糖裂解酶,目前主要应用的有 Hep I、II、III^[1]。其中, Hep I 是目前研究最为广泛的肝素酶,利用 Hep I 的降解作用可以有效阐明肝素的结构^[2-3]、清除体外循环血液中多余的肝素^[4]及制备低分子量肝素(low molecular weight heparins, LMWHs)^[5-6]。然而,从原始的肝素黄杆菌中得到的 Hep I 不稳定且产量低,在 30 °C 下的半衰期只有 10 min,经过一次冻融之后酶活只剩下 45%^[7]。酶活损失巨大,严重影响了 Hep I 的工业化应用,因此现阶段对 Hep I 的研究主要集中于提高其稳定性和产量。Shpigel 等人成功地在大肠杆菌中表达以纤维素结合蛋白(CBD)为标签的 CBD-Hep I 重组酶,并且将 CBD-Hep I 固定在纤维素微球上后应用于 LMWHs 的生产中,但 CBD-Hep I 在大肠杆菌中是以包涵体形式表达的,需要复性才能进一步实现固定化^[8];清华大学的邢新会教授团队构建表达了 MBP-Hep I 融合酶,酶活达到 20 650 IU/L,并通过麦芽糖与 MBP 标签的亲合吸附将 MBP-Hep I 固定在 Fe₃O₄@SiO₂-PEO-maltose 上,通过磁性微球有效分离产物与酶^[9-11];本研究室前期构建了 GST-Hep I 融合酶,在大肠杆菌中表达酶活达到 16 970 IU/L^[12]。

近期,本研究室将助溶的 SUMO 标签蛋白基因片段与 Hep I 基因片段通过重叠 PCR 方法构建重组 pET-30a-SUMO-Hep I-His 表达载体,将 SUMO 蛋白与肝素酶 I N-端融合表达,优化发酵得到高产量的融合肝素酶 I,发酵产物酶活达到 27 860 IU/L,游离酶在 30 °C 的半衰期提高到 1 h。该融合酶显现出较大的工业化应用潜能。

酶的固定化在工业上的应用越来越广泛,相比于游离酶,它能够保证酶的稳定性、产物与酶的快速分离以及酶的重复利用性^[13-14]。因此本研究拟对融合酶 SUMO-Hep I-His 的进一步固定化进行研究。固定化材料 GLK-Gel Ni 是以琼脂糖凝胶为载体,亚氨基二乙酸(IDA)为配基,并螯合金属离子

Ni²⁺而形成的一种亲和层析介质,它利用 Ni²⁺螯合配体与蛋白质表面的组氨酸的咪唑基团紧密结合达到蛋白质的分离纯化,具有吸附量大、分辨率高、选择性好、成本低、易于再生等优点。本研究将 SUMO-Hep I-His 固定于该载体上,达到一步式分离纯化与固定化的效果,并对其固定化的条件、固定化效果以及固定化酶的酶学性质进行了考察。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

肝素酶 Sumo-Hep I-His 质粒由本实验室构建保存;GLK-Gel Ni 由无锡市加莱克色谱公司赠送;大分子肝素钠、牛血清白蛋白(BSA)、卡那霉素、考马斯亮蓝 G-250、乙酸钠、乙酸钙等试剂均购自生物工程(上海)有限公司。

电子天平:梅特勒托利多仪器有限公司;超级恒温水浴槽:上海森信实验仪器有限公司;JY92-II 超声波细胞粉碎仪:宁波新枝生物科技股份有限公司;高速冷冻离心机 CR-22G II:日本日立仪器有限公司;UV-2550 紫外可见分光光度计:岛津有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器:郑州长城科工贸有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肝素酶的提取 将实验室构建保存的含有 Sumo-Hep I-His 的工程菌进行上罐发酵培养,离心菌液获得菌体用超声细胞破碎方法获得肝素酶粗酶液,根据 BSA 标准曲线测定粗酶液中蛋白含量。

1.2.2 酶活测定方法 根据紫外吸收 232 nm 法测定 Hep I 的酶活^[15],酶活力单位定义(IU):每分钟生成 1 μmol 不饱和糖醛酸所需要的酶量为一个活力单位。

酶活公式为

$$\frac{A_{232} \times V_1}{5.5} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{V_2} \text{ IU/mL}$$

其中, A₂₃₂ 为波长 232 nm 下测定的紫外吸收值; V₁

为反应液的总体积; V_2 为加入酶的体积; t 为反应时间;反应的吸光系数为5.5。

固定化酶的蛋白回收率的计算公式为

$$R\% = \frac{A}{A_0} \times 100\%$$

其中, R 为蛋白回收率; A 为固定化酶的蛋白吸附量; A_0 为固定化前加入粗酶液的总蛋白量。

1.2.3 固定化酶制备 在10 mL离心管中加入GLK-Gel Ni、Sumo-Hep I-His粗酶液在4℃下搅拌进行固定化。对于固定化条件优化,分别控制不同的载体与粗酶质量比、反应pH以及固定化时间,具体吸附条件如下:

(1) 载体与粗酶液质量比的优化 4℃条件下,根据粗酶液中的蛋白含量,按照载体与粗酶质量比150:1、100:1、50:1、30:1、10:1的比例进行酶固定化,反应时间4 h,固定化pH 7.0。

(2) 吸附pH的优化 4℃条件下,根据上述最佳载体与粗酶质量比,将GLK-Gel Ni分别加入pH为5、6、7、8、9、10的粗酶液中搅拌吸附4 h后,再分别用相应的缓冲液洗涤,测定不同pH条件下的固定化酶活。

(3) 吸附时间的优化 4℃条件下,根据上述优化条件,固定化吸附分别2、4、6、8、10 h后,用PB缓冲液洗涤,测定不同吸附时间条件下的酶活。

利用上述的最佳固定化条件,将粗酶纯化后进一步用于固定化酶制备,得出纯化酶的固定化酶活和蛋白回收率。

1.2.4 固定化酶与游离酶的酶学性质 对固定化酶与游离酶的最适反应温度、最适反应pH和热稳定性进行研究比较,同时对固定化操作稳定性以及放置稳定性进行测定。具体如下:

(1) 最适反应温度的测定 将固定化酶和游离酶分别于21、24、27、30、33、36、39、42、45、48℃下测定酶活,得出最适反应温度。

(2) 最适反应pH的测定 将固定化酶和游离酶分别在最适反应温度条件下,当pH分别为5.4、5.8、6.2、6.6、7.0、7.4、7.8、8.2、8.6、9.0的酶反应底物时测定酶活,得出最适反应pH。

(3) 热稳定性分析 将固定化酶和游离酶分别放在30℃的恒温水浴锅中不同时间点取样测剩余酶活。

(4) 固定化酶的重复利用性 根据酶活测定方

法,每次反应20 min,测得 A_{232} 计算固定化酶的酶活,连续重复操作8次,计算每次反应后固定化酶的剩余酶活。

(5) 固定化酶的储存稳定性 将固定化酶和游离酶放在4℃冰箱,每隔一段时间测定其酶活,计算剩余酶活。

(6) GLK-Gel Ni重复利用性 将固定上酶的载体用高浓度咪唑洗脱掉酶,然后再重复固定酶,测固定化酶活,以上操作重复5次。

2 结果与分析

2.1 固定化条件的优化

2.1.1 载体与粗酶质量比的优化 由图1结果可知,当酶与载体比例在1:30时,固定化酶活达到 8.34 ± 0.2 IU/ml载体,蛋白回收率为 $(31.83 \pm 0.891)\%$ 。固定化过程中加入的酶量过多时,载体表面容易聚集多层酶,形成空间障碍或扩散限制效应,进而导致酶的活性位点与底物接触不充分,所以酶的催化效率降低;而载体与粗酶质量比适中时,吸附在载体上的酶分子较少,使其能够充分利用其活性位点,但是过少时,酶量不够,固定化效果也不佳,因此在酶与载体比例为1:30时固定化效果最好。

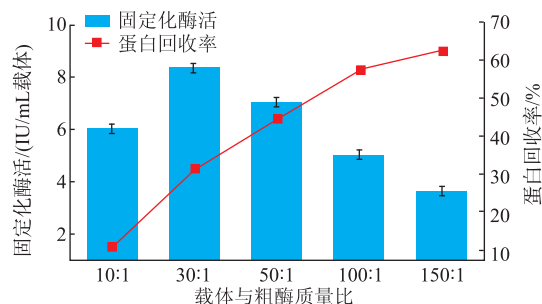


图1 载体与粗酶质量比对吸附的影响

Fig. 1 Effect of weight ratio between support and crude enzyme on adsorption process

2.1.2 吸附pH的优化 固定化环境的pH是影响酶固定化的一个不容忽视的因素。由图2可知,pH为7.0时固定化酶活达到最高,为 8.52 ± 0.24 IU/mL载体,同时酶活回收率达到 $(32.27 \pm 0.881)\%$ 。载体一般在蛋白质等电点附近达到对蛋白质的最大吸附量^[16]。Hep I的等电点为8.5,然而在此pH下,固定化酶活没有达到最高,从图2可看出,pH在7~9之

间固定化酶活比较高,而在酸性环境下,固定化效果明显降低,这可能是 pH 影响了酶的结合基因或催化基因,导致没有得到理论结果,而 pH 7.0 正好是载体的吸附能力与 Sumo-Hep I-His 的活性的平衡点,故固定化 pH 控制在 7.0。

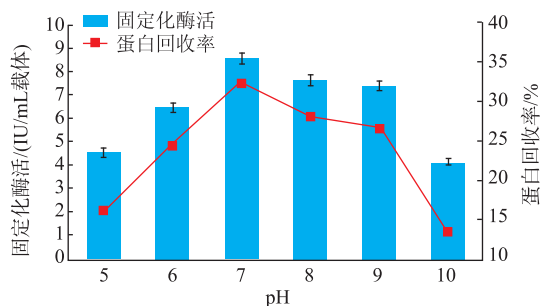


图 2 固定化 pH 对吸附的影响

Fig. 2 Effect of pH on adsorption process

2.1.3 吸附时间的优化 由图 3 可知,随着吸附时间的延长,固定化酶活不断提高,在固定化时间 6 h 时固定化酶活达到最高,其酶活和酶活回收率分别达到 10.07 ± 0.35 IU/mL 载体和 $(38.76 \pm 0.964)\%$ 。时间继续延长,在 10 h 后固定化酶活有所下降,原因在于吸附一定时间后酶吸附量达到饱和状态,随着时间的延长,载体上吸附的酶因为吸附不牢固而从载体上脱离,而且吸附时间过长导致酶本身部分失活,故控制最佳反应时间为 6 h。

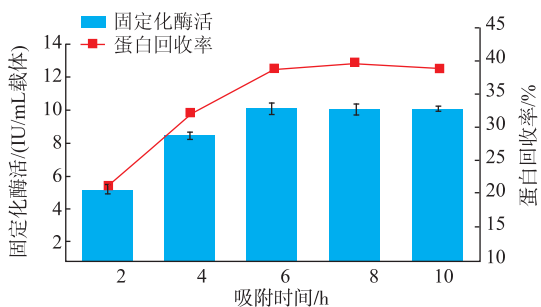


图 3 吸附时间对吸附的影响

Fig. 3 Effect of adsorption time on the adsorption process

2.1.4 GLK-Gel Ni 与其他载体固定化效果比较 本研究将 Ni²⁺整合的琼脂糖凝胶载体(GLK-Gel Ni)与其他载体进行了比较(表 1)。GLK-Gel Ni 的固定化效果远高于其他两种载体,固定化酶活是硅胶的 2 倍,是 Bettsep Ni 的 1.5 倍,但是蛋白吸附量相比于硅胶和 Bettsep Ni 并未提高,说明可能是 GLK-Gel Ni 的特异性比较好,故固定化比酶活也高于其他两个载体。但是 3 种固定化酶的酶活均没有达到

预期的效果,可能是使用粗酶进行固定化,杂蛋白在一定程度上阻碍了酶与载体的吸附。针对这一问题,将纯化后的 Hep I 固定于 GLK-Gel Ni,固定化酶活达到 17.93 IU/mL 载体,蛋白回收率为 40.17%,说明杂蛋白对酶的固定化具有一定的空间阻碍作用。

表 1 GLK-Gel Ni 与其他载体固定化效果比较

Table 1 Comparison of immobilization effect between GLK-Gel Ni and other supports

载体	酶活/(IU/mL 载体)	吸附蛋白量/(mg/mL 载体)	酶活回收率/%
GLK-Gel Ni	10.07±0.35	8.2±0.518	22.76±0.75
硅胶	5.19±0.14	6.94±0.467	12.71±0.66
Bettsep Ni	6.58±0.17	10.87±1.452	14.87±0.57

2.2 固定化酶与游离酶的酶学性质分析

2.2.1 温度对肝素酶 I 活力的影响 由图 4 可看出,游离酶和固定化酶的最适反应温度分别在 30 °C 和 33 °C,且在同一温度下固定化酶的相对酶活总是高于游离酶,说明酶经固定化后耐热性明显提高。最适反应温度的提高有可能是因为酶经固定化后,酶活性中心的氨基酸残基、其所带的电荷及高级结构等发生了改变,从而使固定化酶的最适反应温度高于游离酶。

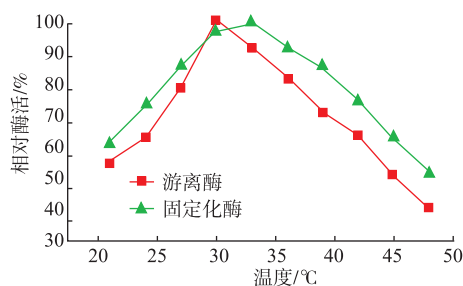


图 4 温度对肝素酶 I 活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on Hep I activity

2.2.2 pH 对肝素酶活力的影响 由图 5 可看出,固定化酶的曲线始终在游离酶的上方,说明固定化酶对反应 pH 的耐受性比游离酶好,但是固定化酶和游离酶都在 pH 7.0 时酶活达到最高。本研究中,载体 GLK-Gel Ni 带正电,故载体微环境偏碱性,然而固定化酶的最适反应 pH 并没有向酸性移动,而是和游离酶一致。研究表明最适反应 pH 不仅与载体带电性有关,还与酶特性、反应底物、反应产物、酶构象改变等因素都有关系^[17]。

2.2.3 热稳定性分析 固定化酶最重要的优点之一就是相对于游离酶其稳定性增强,故本研究考察了酶在 30 ℃下酶的失活速度,结果如图 6 所示。游离酶在 30 ℃下 1 h 酶活降到了 50%,而固定化酶在 30 ℃下 1 h 仍保持了 90%以上的酶活,8 h 后才达到固定化酶的半衰期,即固定化酶的热稳定性相比于游离酶提高了 7 倍。原因可能是固定化后酶活力的释放减缓,并且固定化后限制了酶空间构象的改变,从而抑制了酶的自降解,因此酶的热稳定性显著提高。

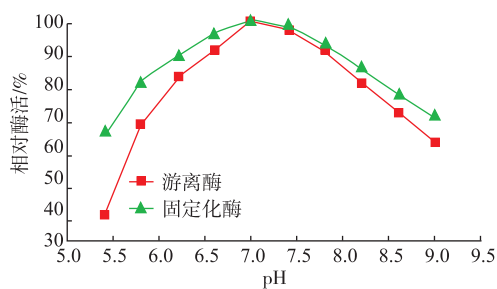


图 5 pH 对肝素酶 I 活力的影响

Fig. 5 Effect of PH on Hep I activity

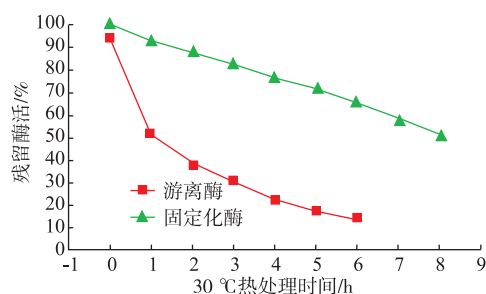


图 6 固定化酶与游离酶的热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of free and immobilized enzymes

2.2.4 固定化酶的重复利用性 如图 7 所示,随着固定化酶的重复利用次数的增加,固定化酶的相对酶活缓慢下降,反应 8 次后,剩余酶活 75.8%。表现出较好的重复利用性,由此可知,该固定化酶在制备低分子量肝素的过程中可以保持良好的活性,充分利用酶。

2.2.5 固定化酶的储存稳定性 游离酶在 4 ℃冰箱放置 5 d 后,酶活降低了 50%,之后迅速下降,而固定化酶在放置 30 d 时,酶活仍保持了初始酶活的 90%,放置 60 d 还剩 75%酶活,之后相对酶活下降明显(图 8)。上述固定化酶与游离酶的储存稳定性的差异表明酶经固定化之后,其储存稳定性得到了

显著提高,这对于固定化酶用于工业生产提供了重要保证。

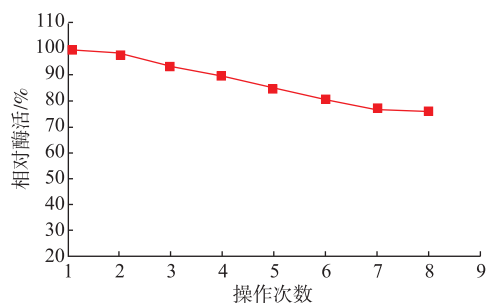


图 7 固定化酶的操作稳定性

Fig. 7 Operational stability of immobilized enzyme

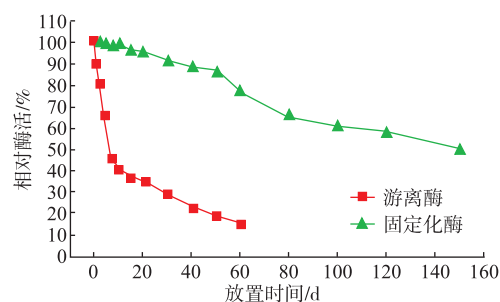


图 8 固定化酶与游离酶的储存稳定性

Fig. 8 Storage stability of immobilized and free enzymes

2.2.6 GLK-Gel Ni 的重复利用性 从图 9 可以看出,GLK-Gel Ni 在洗脱重复固定后 5 次后,其固定化酶活仍保持了原始酶活的 88.9%,而且曲线下降缓慢,显示了 GLK-Gel Ni 良好的重复利用性。

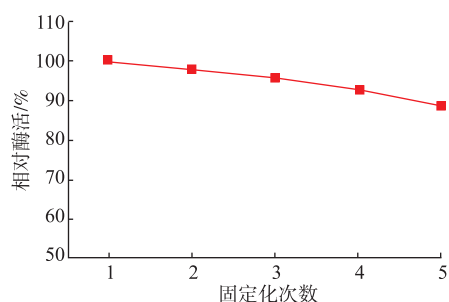


图 9 GLK-Gel Ni 的重复利用性

Fig. 9 Recyclability of GLK-Gel Ni

3 结 语

本研究通过利用 GLK-Gel Ni 对 Sumo-Hep I-His 亲和吸附作用将酶固定到载体上,通过固定化条件优化,固定化酶酶活达到 10.07 ± 0.35 IU/mL 载体。此外固定化酶在 30 ℃的热稳定性比游离酶

提高了7倍,在4℃的储存稳定性也得到显著提高,在60d后,仍保持了75%的初始酶活,而且酶的重复利用性良好。Sumo-Hep I-His的这种固定化方

法成功解决了肝素酶在实际应用中稳定性差、快速失活等缺陷,且该固定化酶可以多次重复利用,具有较好的工业应用潜力。

参考文献:

- [1] CHEN Yin, YE Fengchun, KUANG Ying, et al. Progress in the study of heparinases [J]. **China Biotechnology**, 2007, 27(8): 116-124. (in Chinese)
- [2] KORIR A K, LARIVE C K. Advances in the separation, sensitive detection and characterization of heparin and heparan sulfate[J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2009, 393(1): 155-169.
- [3] GUERRINI M, BECCATI D, SHRIVER Z, et al. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events[J]. **Nature Biotechnology**, 2008, 26(6): 669-675.
- [4] LINHARDT R J, COONEY C L, TAPPER D, et al. An immobilized microbial heparinase for blood deheparinization[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1984, 9(1): 41-55.
- [5] PERVIN A, GALLO C, JANDIK K A, et al. Preparation and structural characterization of large heparin-derived oligosaccharides [J]. **Glycobiology**, 1995, 5(1): 83-95.
- [6] YE F, KUANG Y, CHEN S, et al. Characteristics of low molecular weight heparin production by an ultrafiltration membrane bioreactor using maltose binding protein fused heparinase I[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2009, 46(2): 193-198.
- [7] LOHSE D L. Purification and characterization of heparin lyases from *Flavobacterium-heparinum* [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1992, 267(34): 24347-24355.
- [8] SHPIGEL E, GOLDLUST A, EFRONI G, et al. Immobilization of recombinant heparinase I fused to cellulose-binding domain[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1999, 65(1): 17-23.
- [9] CHEN Y. Production of MBP-HepA fusion protein in recombinant *Escherichia coli* by optimization of culture medium[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2007, 34: 114-121.
- [10] ZHOU L, WU J, ZHANG H, et al. Magnetic nanoparticles for the affinity adsorption of maltose binding protein (MBP) fusion enzymes[J]. **Journal of Materials Chemistry**, 2012, 22(14): 6813-6818.
- [11] WU J, ZHOU L, ZHANG H, et al. Direct affinity immobilization of recombinant heparinase I fused to maltose binding protein on maltose-coated magnetic nanoparticles[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2014, 90: 170-177.
- [12] LIU Weichao, CHENG Yongmei, DENG Chao, et al. Prokaryotic expression and purification of GST-His-Heparinase I double labelled fusion protein[J]. **Industrial Microbiology**, 2014, 44(5): 51-56. (in Chinese)
- [13] MARNER W D, SHAIKH A S, MULLER S J, et al. Enzyme immobilization via silaffin-mediated auto encapsulation in a biosilica support[J]. **Biotechnology Progress**, 2009, 25(2): 417-423.
- [14] HU Yafang, LIU Yurong, DING Keyi, et al. Immobilization and application of a composite enzyme[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(4): 416-421. (in Chinese)
- [15] YU P, WU Y. Expression of the heparinase gene from *Flavobacterium heparinum* in *Escherichia coli* and its enzymatic properties [J]. See comment in PubMed Commons below **Carbohydr Polym**, 2012, 90(1): 348-352.
- [16] GULAY B, MELTEM Y. Reversible immobilization of laccase to poly (4-vinylpyridine) grafted and Cu (II) chelated magnetic beads: biodegradation of reactive dyes[J]. **Bioresource Technology**, 2010, 101: 6615-6621.
- [17] RAPPERT S, MULLER R. Microbial degradation of select edorous substances[J]. **Waste Management**, 2005, 25: 940-954.