

## 重组羧肽酶原B突变体C383A的纯化与性质研究

张洛盛, 吴珊, 吴倩, 李素霞\*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

**摘要:** 目的 纯化羧肽酶原B突变体C383A并研究其酶学性质。方法 用DEAE-FF离子交换树脂纯化C383A, 测定其动力学参数, 温度对酶活性的影响、温度稳定性、最适pH以及pH稳定性等酶学性质, 并与野生型比较。结果 纯化后获得高纯度突变体C383A, 与野生型相比, 催化效率及稳定性均有提高, 但与底物的亲和力降低, 随着温度的上升催化速率的增长率低于野生型。结论 将重组羧肽酶原B第383位Cys突变为Ala可对酶的性质产生影响, 与野生型比较, C383A提高了酶的催化效率及温度和pH稳定性。

**关键词:** 重组羧肽酶原B; 定点突变; 纯化; 酶学性质

中图分类号: Q555 文献标识码: A 文章编号: 1672-979X(2010)09-0308-05

### Study on Purification and Property of Recombinant Procarboxypeptidase B (Mutant C383A)

Zhang Luo-sheng, WU Shan, WU Qian, LI Su-xia

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract: Objective** To study the purification and enzymatic property of procarboxypeptidase B (mutant C383A).

**Methods** The mutant C383A was purified by DEAE-FF Ion-exchange Chromatography. The kinetic parameters and enzymatic property of mutant C383A which were compared with that of wild-type procarboxypeptidase B were measured, including the effects of temperature on activity and stability of mutant C383A, the optimal pH and the stability of pH. **Results** Compared with the wild-type procarboxypeptidase B, the purified mutant C383A with a high purity had the enhanced catalytic efficiency and stability. However, the affinity between mutant C383A and substrate was decreased and the increase of catalytic rate was lower than that of the wild-type as the temperature rose.

**Conclusion** Cys383 mutation to Ala can affect the property of procarboxypeptidase B. Compared with the wild-type, the mutant C383A has the enhanced catalytic efficiency and stability to temperature and pH.

**Key Words:** recombinant procarboxypeptidase B; site-directed mutation; purification; enzymatic property

羧肽酶B (carboxypeptidase B, CPB) (EC3.4.17.2) 属金属羧肽酶家族, 是一种切割蛋白质或多肽C端Arg、Lys等碱性氨基酸残基的外肽酶, 主要应用于蛋白质切割和测序以及疾病诊断<sup>[1]</sup>, 以及重组胰岛素的生产工艺中<sup>[2]</sup>。

羧肽酶原B ( $45 \times 10^3$ ) 由胰蛋白酶激活生成有催化活性的羧肽酶B ( $35 \times 10^3$ )<sup>[3]</sup>。制备羧肽酶B的传统方法是从动物胰脏中提取, 繁琐且成本很高<sup>[4]</sup>。我们已成功构建鼠源羧肽酶原B (pCPB) 大肠杆菌BL21 (DE3) 高效表达菌株, 以包涵体形式表达并

成功复性<sup>[5]</sup>。羧肽酶原B Cys383位点在C端 $\alpha$ -螺旋二级结构中, 此位点靠近酶活性中心<sup>[6]</sup>。Cys383被Ala替换后, 酶的催化域构象及电荷分布可能发生改变, 从而会影响其酶学性质。为弄清Cys383位点对酶性质的影响, 我们构建突变体C383A表达菌株, 并研究了复性后纯化和酶学性质。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 材料

LB培养基: 1 L培养基含胰蛋白胨10 g, 酵母抽提物5 g, 氯化钠10 g。

收稿日期: 2010-05-28

作者简介: 张洛盛 (1985-), 男, 湖北人, 硕士研究生, 研究方向为重组蛋白克隆与表达, 包涵体复性

E-mail: zhangluosheng@126.com

\*通讯作者: 李素霞, E-mail: lisuxia@ecust.edu.cn, Tel: 021-64252255

PCR引物(上海生工生物公司合成); DNA测序(上海英骏生物技术公司测定); 高保真酶 pyrobest DNA polymerase、限制性内切酶、DNA连接酶T4 Ligase[宝生物工程(大连)公司]。其余试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 突变体C383A表达菌株的构建** 由于Cys 383位点位于C端,  $\alpha$ -螺旋结构靠近C端, 故以含野生型序列的质粒为模板, 直接采用3'-端引物引入突变位点。引物设计为, 5'端5'-CATGCCATGGAACATGCTTCCGAGGAGC-3'(含Nco I酶切位点); 3'端5'-CCCAAGCTTTCCTAA TATAGATGTTCTCGGACATAATT GGCAATGTACT TGACTGCAAGCATTGTCTCCTCAGCGGTCTGGC GGA-3'(含HindIII酶切位点), 突变序列PCR扩增后连接至pET-28a(+)(Novagen)表达载体。选用大肠杆菌BL21(DE3)作为表达菌株(由本实验室保存)。

**1.2.2 酶活性及蛋白质浓度测定** 羧肽酶的活性测定根据Folk and Schirmer<sup>[7]</sup>法, 以马尿酸-L-精氨酸为底物, 将25℃, 1 min催化降解1  $\mu$ mol马尿酸-L-精氨酸所需的酶量定义为1个酶活性单位(U)。蛋白质浓度用Bradford法测定<sup>[8]</sup>, 用牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白。

**1.2.3 C383A的纯化** 用20 mmol/L Tris pH 8.0平衡DEAE-FF离子交换树脂, 将复性液酶解过滤后上样, 经Tris-HCl缓冲液平衡后, 用含0~0.3 mmol/L NaCl的洗脱缓冲液连续梯度洗脱目的蛋白。

## 1.2.4 C383A性质研究

**1.2.4.1 动力学参数测定** 根据米氏方程利用双倒数法测定 $K_m$ 及 $V_{max}$ , 用马尿酸-L-精氨酸为底物(0.05~0.3 mmol/L), 测定条件均为25℃, 至少重复3次。

**1.2.4.2 温度对酶活性的影响** 底物溶液分别在4, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80℃预置5 min, 然后分别加入酶液测活性。以底物温度25℃的酶活性为100%计算相对酶活性并与野生型比较。

**1.2.4.3 温度稳定性** 将纯化后浓度1 mg/mL的酶液分别置于4, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80℃水浴中, 每隔相同时间取样测定活性, 以水浴前的酶液活性为

100%计算残余酶活性并与野生型比较。

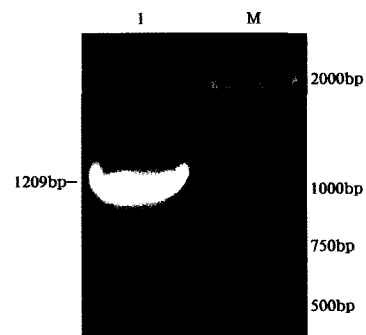
**1.2.4.4 最适pH** 底物分别溶解于pH 3.0~12.0的缓冲液中, 于25℃测定纯化后的酶液活性。25 mmol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.0~6.0), 磷酸盐缓冲液(pH 6.5~7.5), Tris-HCl缓冲液(pH 8.0~8.5), Gly-NaOH缓冲液(pH 9.5~12.0), pH均在25℃配制。以底物在pH 7.65的酶活性为100%计算相对酶活性并与野生型比较。

**1.2.4.5 pH稳定性** 将纯化后浓度1 mg/mL的酶液在25℃水浴置于pH 3.0~12.0缓冲液中12 h后, 取样测定酶活性。25 mmol/L醋酸-醋酸钠缓冲液, 磷酸盐缓冲液, Tris-HCl缓冲液, Gly-NaOH缓冲液均在25℃配制。以水浴前的初始酶活性为100%计算残余酶活性并与野生型比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 C383A的构建与表达

PCR扩增结果见图1。用含有突变位点的引物使用高保真DNA聚合酶Pyrobest成功扩增出含有突变位点的目的条带。



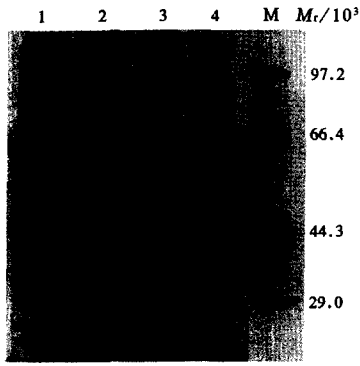
1. C383A PCR产物; M. DNA Marker

图1 PCR扩增结果

将突变序列连接至pET-28a(+)-空载并转化至BL21(DE3)菌株表达。C383A表达菌株的表达鉴定结果见图2, 加入IPTG后成功实现C383A的表达。菌体超声破碎后上清中没有目的条带, C383A仍以包涵体形式表达。

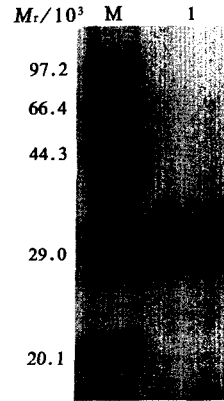
### 2.2 C383A酶解后纯化

用含0~0.3 mmol/L NaCl洗脱缓冲液连续梯度洗脱, 收集活性C383A峰, 洗脱曲线见图3, SDS-PAGE检测结果见图4。C383A达到很高纯度, SDS-PAGE检测无杂带, 活性达到556 U/mL。



1. 诱导前全菌体; 2. 诱导后全菌体; 3. 破碎后上清; 4. 破碎后沉淀; M. 低相对分子质量蛋白质Marker

图2 C383A表达菌株表达鉴定结果SDS-PAGE分析



M. 低相对分子质量蛋白Marker; 1. 突变体C383A

图4 C383A SDS-PAGE纯度检测结果

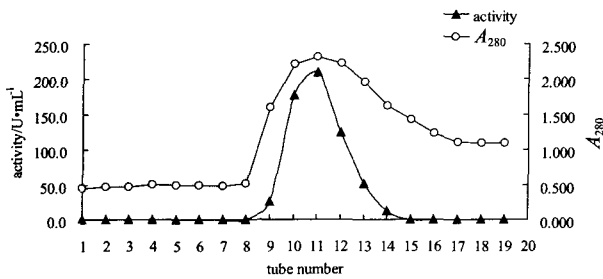


图3 C383A洗脱曲线

C383A经离子交换树脂DEAE-FF纯化结果见表1, 纯化后蛋白回收率62.6%, 酶活回收率80.4%。

2.3 C383A与野生型性质比较

2.3.1 动力学参数测定 C383A与野生型动力学参数比较结果见表2。C383A的K<sub>m</sub>、V<sub>max</sub>、k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> (表明酶催化效率的参数) 均大于野生型。表明羧肽酶原B Cys383位点突变为Ala后, 酶与底物的亲和力降低,

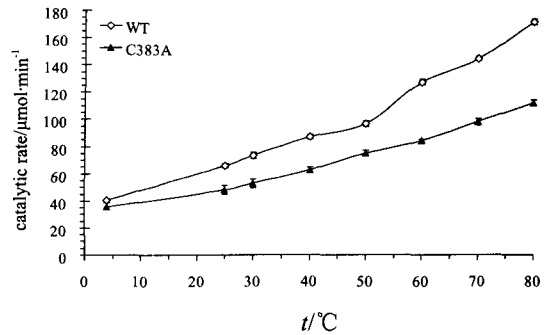


图5 温度对酶活性的影响

但催化效率有所提高。

2.3.2 温度对酶活性的影响 温度对酶活性的影响测定结果见图5。C383A和野生型的反应速率均随温度升高而提高, 但野生型的提高速率明显大于C383A。这主要是因温度升高后酶与底物的分子碰撞加剧, 野生型与底物的亲和力较高致催化速率较高。

表1 C383A纯化表

	总蛋白/mg	总酶活性/U	蛋白回收率/%	酶活性回收率/%
纯化前	726.3	25 020	62.6	80.4
纯化后	454.6	20 108		

表2 C383A与野生型动力学参数比较

	K <sub>m</sub> /mmol	V <sub>max</sub> /μmol·min <sup>-1</sup>	k <sub>cat</sub> /10 <sup>4</sup> s <sup>-1</sup>	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> /10 <sup>4</sup> mmol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
野生型	0.31 ± 0.04	205.73 ± 9.65	1.03 ± 0.05	3.32 ± 0.16
突变体C383A	0.47 ± 0.06	276.10 ± 19.69	1.66 ± 0.12	3.53 ± 0.25

注: 实验结果均重复3次以上。

**2.3.3 温度稳定性** 温度低于40 ℃时, C383A与野生型活性均较稳定; 40 ℃温育8 h后, C383A和野生型活性均降低, 野生型活性损失较快, 见图6 (a); 温度升至50 ℃时, 温育2 h后C383A与野生型活性均下降, 野生型活性下降速率明显大于C383A, 见图6 (b); 温度升至60 ℃时, 野生型刚水浴就几乎丧失了全部活性, 而C383A在60 ℃条件下温育30 min仍具有约20 %的活性, 见图6 (c)。可见C383A热稳定性更好。

**2.3.4 最适pH** C383A最适pH与野生型相近, 见图7。但pH 6.0~7.5时C383A的催化效率明显高于野生型; pH<6.0的酸性环境下, C383A与野生型活性都基本丧失; pH>8.0的碱性环境下, C383A催化效率高于野生型。认为C383A的催化范围比野生型广泛。Cys383位点突变为Ala后, 酶催化域的微环境可能发生改变, 使得C383A在更广的pH范围内有较高的催化能力。

**2.3.5 pH稳定性** C383A与野生型的pH稳定性测定结果见图8。两者在pH 5.0~9.0范围内均很稳定, 但在pH<5.0和pH>9.0的较强酸碱条件下活性均降低, C383A活性降低的程度小于野生型。Ala取代Cys383后, 可能影响酶分子表面局部电荷分布, 而这种局部的变化使C383A有较强的pH稳定性但不显著, 其稳定性随pH值变化的总趋势仍与野生型相似。

### 3 讨论

重组羧肽酶原B的Cys383位点在C端 $\alpha$ -螺旋结构中靠近酶催化结构域。Cys383被其它氨基酸替代后C端 $\alpha$ -螺旋结构内局部基团间作用力会发生变化, 从而可能会对催化域产生影响使酶的性质发生改变。我们研究C383A的酶学性质并与野生型比较, 表明C383A催化效率和稳定性都有提高, 这为进一步研究重组羧肽酶原B突变体奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 张晓彦, 李素霞, 顾俊杰, 等. 重组羧肽酶原B的体外变复性研究[J]. 分子科学学报, 2005, 21 (4): 51-57.
- [2] 李素霞, 田丽萍, 张晓彦, 等. 重组羧肽酶B在胰岛素原C肽制备工艺中的应用[J]. 华东理工大学学报自然科学版, 2004, 30 (4): 387-391.
- [3] Coll M, Guasch A, Aviles F X., et al. Three-dimensional structure of porcine procarboxypeptidase B: a structural basis of its inactivity [J]. *EMBO J*, 1991, 10(3): 1-9.
- [4] Mustapha H, Abdelkrim S, Fabienne G. Purification and some

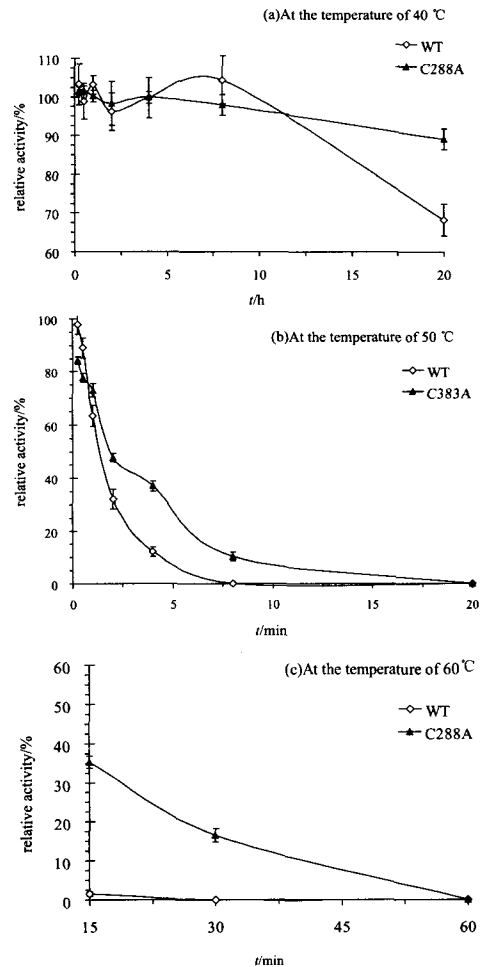


图6 突变体C383A与野生型温度稳定性的比较

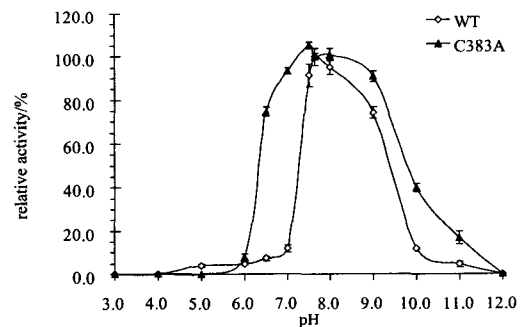


图7 C383A与野生型最适pH比较

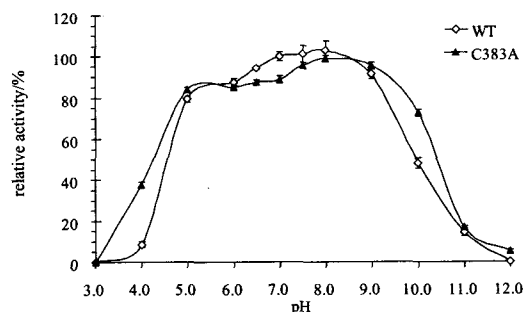


图8 突变体C383A与野生型pH稳定性比较

## 超临界CO<sub>2</sub>提取五味子木脂素的工艺研究

戴军<sup>1</sup>, 徐佐旗<sup>2</sup>, 赵婷<sup>2</sup>, 闫舒<sup>2</sup>, 仰榴青<sup>2\*</sup>

(1. 江苏中兴药业有限公司, 江苏 镇江 212009; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

**摘要:** 目的 研究超临界CO<sub>2</sub>流体提取(SFE-CO<sub>2</sub>)北、南五味子木脂素的工艺。方法 以五味子总木脂素提取率为考察指标, 以提取压力、提取温度、CO<sub>2</sub>流量等3项因素设计3个水平进行正交试验设计, 确定最佳工艺。用薄层扫描色谱法测定提取物中4种主要木脂素(五味子甲素、五味子乙素、五味子酯甲和五味子醇甲)的含量, 并与传统的乙醇提取法比较。

**结果** 超临界CO<sub>2</sub>流体提取五味子木脂素的优选工艺为: 提取压力25 MPa, 提取温度35 °C, CO<sub>2</sub>流量2 L/min。北、南五味子总木脂素的平均提取率分别为93.2%、95.5%, 提取物纯度分别为13.0%、9.2%, 北五味子提取物中五味子乙素含量2.89%。**结论** SFE-CO<sub>2</sub>法提取效率高、选择性好、操作简便, 明显优于传统的乙醇提取法, 可用于提取五味子木脂素。

**关键词:** 北五味子; 南五味子; 超临界CO<sub>2</sub>提取; 正交试验; 木脂素; 五味子乙素

中图分类号: R284.2; R283.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-979X(2010)09-0312-04

### Study on Extraction Process of Lignans from Fruits of *Schisandra chinensis* by Supercritical CO<sub>2</sub> Fluid

DAI Jun<sup>1</sup>, XU Zuo-qi<sup>2</sup>, ZHAO Ting<sup>2</sup>, YAN Shu<sup>2</sup>, YANG Liu-qing<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Zhongxing Pharmaceutical Co., Ltd., Zhenjiang 212009, China; 2. Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract: Objective** To study the extraction process of lignans in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *S. sphenanthera* Rehd. et Wils. by supercritical CO<sub>2</sub> fluid (SFE-CO<sub>2</sub>). **Methods** The orthogonal experimental design was used to optimize the SFE-CO<sub>2</sub> conditions including extraction pressure, extraction temperature and flow rate of CO<sub>2</sub>, which was guided by the extraction rate of total lignans. The contents of four lignans in the extracts of *Schisandra chinensis* and *S. sphenanthera* were determined simultaneously by TLC. The SFE-CO<sub>2</sub> technology was compared with traditional solvent extraction. **Results** The optimal SFE-CO<sub>2</sub> conditions were as follows: extraction pressure of 25 MPa, extraction temperature of 35 °C, CO<sub>2</sub> flow rate of 2 L/min. The average extraction rates of lignans in *Schisandra chinensis* and *S. sphenanthera* were 93.2% and 95.5%, with the purity of extracts of 13.0% and 9.2%, respectively. The content of  $\gamma$ -schisandrin in the extract of *Schisandra chinensis* was 2.89% by SFE-CO<sub>2</sub>. **Conclusion** Compared with traditional solvent extraction, SFE-CO<sub>2</sub> is a better way for the extraction of lignans from the fruits of *Schisandra*

收稿日期: 2010-02-03

基金项目: 江苏省高校自然科学基金资助项目(02KJD350001); 镇江市产学研合作计划项目(zjczxy200814)

作者简介: 戴军(1966-), 男, 江苏泗阳人, 工程师, 主要从事中药新产品开发 E-mail: xzydj@126.com

\*通讯作者: 仰榴青(1965-), 女, 江苏丹阳人, 教授, 主要从事天然产物提取及功能食品开发

E-mail: yangliuqing@ujs.edu.cn

- properties of a carboxypeptidase B from dogfish *Scyliorhinus canicula* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 110(4): 791-798.
- [5] Li S X, Zhang Y J, Tian L P. Cloning and expression of a new rat procarboxypeptidase B gene in *Escherichia coli* and purification of recombination carboxypeptidase B[J]. *Protein Peptide Lett*, 2003, 10(6):581-590.
- [6] Pedro J B P, Sonia S M, Baldomero O. Human procarboxypeptidase B: three-dimensional structure and implications for thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) [J]. *Mol Biol*, 2002, 321(3):537-547.
- [7] Folk J E, Piez K A, Carroll W R, et al. Carboxypeptidase B: IV. purification and characterization of the porcine enzyme [J]. *J Biol Chem*, 1960, 235(2):2272-2277.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976(2), 72: 248-54.