

提 要

Aeropyrum pernix K₁，是 1993 年从日本海岸火山口分离的一种超嗜热古细菌，它最适生长温度为 95℃，并能产生多种嗜热酶。近年来，随着嗜热酶相继得到开发，使其在许多领域发挥了重要作用。嗜热酶不仅具有化学催化剂无法比拟的优点，而且稳定性极好，可以克服中温酶及低温酶在应用中常常出现的生物学性质不稳定的现象，从而可用于催化很多高温化学反应。这将极大地促进生物技术产业的发展，从而带动技术水平和生活质量的提高。目前，超嗜热古细菌嗜热酶的研究还处于初期阶段，其中既具有磷脂酶 A₂ 活力又具有酯酶活力的嗜热酶 APE 2325 的研究具有重要意义。

磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, EC3.1.1.4, 简称 PLA₂) 具有很多生物学功能，参与许多生理活动，近年来发现它还具有广泛的心血管药理效应，从而引起人们新的研究兴趣。正是 PLA₂ 这种相对简单的化学结构和复杂的药理生理功能之间的反差，使之成为研究脂质代谢、脂蛋白代谢、生物膜磷脂结构以及脂-蛋白相互作用的结构和功能的重要工具酶。近年来，随着分子生物学技术的迅速发展，国外对酯酶基因的克隆研究很活跃，促进了酯酶的生物特性及相关功能的研究，而国内这方面的研究则起步较晚。

基于古细菌的进化位置和嗜热磷脂酶 A₂ 和酯酶的重要作用，我们开展了对嗜热酶 APE 2325 的性质、结构和功能进行了研究。

第一章 前言

1. 古细菌

1977 年 Woese 等人根据 200 多种细菌和真核生物的核糖体小

亚基 RNA(SSU rRNA)的部分序列进行相似矩阵分析,结果发现产甲烷菌、极端嗜盐菌和硫依赖嗜热菌与其它细菌、真核生物不同,于是他们提出古细菌说法。又因为典型代表产甲烷菌的生存环境与想象中原始地球的厌氧环境类似,故称为古细菌,其余细菌称为真细菌。把地球上的生物分为真细菌、古细菌和真核生物三超界,代替目前普遍接受的生物的五界系统。5S rRNA 序列和肽链延长因子 EF-1 α /Tu,EF-2/G,H⁺-ATPase 等蛋白质序列,都说明古细菌与真核生物的亲缘关系比真细菌近⁽¹⁻⁴⁾。在目前国际广泛采用的以 16/18 rRNA 序列为基础的进化树分析中,古细菌代表了所有最原始生物形态的分支,即在目前所有的生命形态中,古细菌最接近生命的最原始形态。古细菌的发现改变了传统生物分类的界限,提供了一种研究生物进化及生命起源的新方法。

目前发现的古细菌除少数几种外均为嗜热古细菌,已知的嗜热古细菌可分为三个家族:第一家族为硫依赖型嗜热古细菌;第二家族为硫还原型嗜热古细菌;第三家族为甲烷起源型嗜热古细菌。大部分的嗜热古细菌都为硫依赖型嗜热古细菌,硫依赖型嗜热古细菌又分为两类:第一类为厌氧型的硫依赖型嗜热古细菌;第二类为需氧型的硫依赖型嗜热古细菌。而大部分硫依赖型嗜热古细菌都为厌氧异养生物,依靠环境中的单质硫还原为硫化氢,提供细胞生长所需要的能量。第二类的需氧型的硫依赖型嗜热古细菌主要生长在酸性环境中,利用硫单质氧化为硫酸,提供细胞生长所需要的能量。仅有少数几种可以在缺少硫的环境中生长,如 *Aeropyrum pernix* K₁⁽⁵⁾等等。不同的生存环境决定了古细菌不同的生理特性及适应性。利用其生活环境的特异性,可以寻找到不同类型的古细菌。

近年来,随着人们对生物进化机制与极端环境微生物的深入研

究，古细菌日益引起了世界科学工作者的广泛关注。利用不断发展与更新的技术，人们发现了越来越多的古细菌，特别是基因工程技术的应用，使部分古细菌的基因全序列被测定。虽然对古细菌基因组成、结构功能已有一定的了解，但是所掌握的知识还很有限。随之对古细菌研究的不断深入，必将加深科学工作者对生命原始形态的特性及生物进化的更进一步的认识。古细菌的研究已经成为探索生命起源与生命进化的一个有利工具。

2. 嗜热酶

1985 年第一种嗜热酶即 TaqDNA 聚合酶被成功的用于聚合链式反应 (PCR) 后，生长在特殊高热环境下的微生物正日益引起人们的重视。目前，许多具有水解酶活性的嗜热酶 (thermophilic enzyme, 55-80°C) 相继得到了开发，并在许多领域发挥了重要作用。近年来，人们又从海底热流的嗜热性古核菌中分离得到超级嗜热酶 (hyperthermophilic enzyme, 80-113°C)，为现代酶工程技术展现了新的应用前景。嗜热酶不仅具有化学催化剂无法比拟的优点，如催化效率高和底物专一性强，而且酶的稳定性极好，因而可以克服中温酶 (mesophilic enzyme, 20-55°C) 及低温酶 (psychrophilic enzyme, -2-20°C) 在应用中常常出现的生物学性质不稳定的现象，从而使很多高温化学反应过程得以实现，这将极大地促进生物技术的发展，从而带动技术水平和生活质量的提高。目前，对嗜热酶的研究还处于初期阶段，但对酶的嗜热机制、稳定性机制及应用前景已有一些文献报道^[6]。

然而，研究发现大多数嗜热菌生长速度较低，培养条件苛刻，因此通过培养野生菌来获得大量嗜热酶是极其困难的。随着基因工程技术的发展，人们可以把嗜热菌中的目的基因在中温宿主中表

达，这样就能在温和的培养条件下得到大量的嗜热酶。目前，一些从嗜热菌中获得的基因已在大肠杆菌等中温宿主中得到了成功地表达⁽⁷⁻⁹⁾。

随着 DNA 测序技术的提高，许多嗜热菌的基因组已经被解析。通过与中温菌的已知基因序列对比，已推测得到许多酶蛋白基因序列，但酶的特性还需要在基因表达后得到进一步的表征。在古核菌基因组中，还有大约 40% 的未知功能基因，对这些基因所表征蛋白的研究和开发，将为工业过程提供新的丰富的酶资源⁽¹⁰⁻¹²⁾。

利用嗜热酶作为生物催化剂有如下的优点：

(1) 备成本低。因为嗜热酶的稳定性高，所以可以在室温下分离提纯和包装运输，并且能长久地保持活性。

(2) 加快了动力学反应。随着反应温度的提高，分子运动速度加快，酶催化能力加强。

(3) 对反应器冷却系统的要求标准低，因而减少了能量消耗。由于嗜热酶有耐高温的特性，所以生产中不需要复杂的冷却装置。一方面节省了开支，另一方面也降低了冷却过程对环境所造成的污染。

(4) 提高了产物的纯度。在嗜热酶催化反应条件下（超过 70 °C），很少有杂菌生存，从而减少了细菌代谢物对产物的污染。由于嗜热酶的高温反应活性，以及对有机溶剂、去污剂和变性剂的较强抗性，使它在食品、医药、制革、石油开采及废物处理等方面都有广泛的应用潜力。

3. 酯酶简介

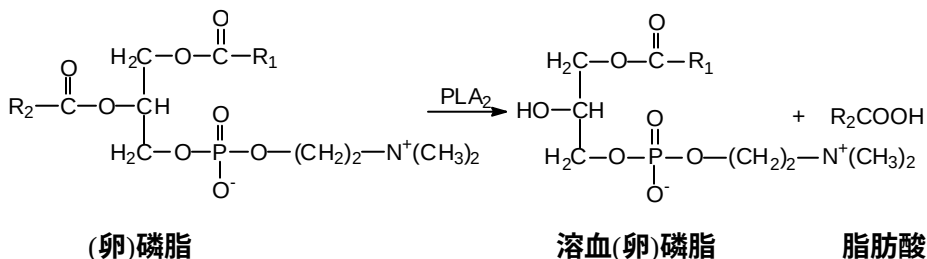
酯酶（Esterases, EC 3.1.1.1）是一类广泛分布于组织与器官的丝氨酸水解酶类，能水解许多含有羧酯键、硫酯键、酰胺键的内

源性及外源性物质。其主要功能是参与脂质代谢、信号传导及维持生物膜结构的完整性，还可以在有机相完成酯化、转酯和酯交换等众多反应，而且其中的大多数反应具有不对称性，可以专一性用于制备许多利用化学法难以合成的手性化合物（如液晶、光学活性药物和农药等）及其前体。

近年来，随着分子生物学技术的迅速发展，国外对酯酶基因的克隆研究很活跃，已有几种微生物酯酶基因得到控制和表达，促进了酯酶的生物特性及相关功能的研究，而国内这方面的研究则起步较晚。

4. PLA₂ 简介

PLA₂ 是磷脂酶中的一种，系统名称为磷脂酰 2- 酯酰水解酶 (phosphatidylcholine-2-acylhydrolase)，它能酶促水解甘油磷脂的第二位酯酰键，生成溶血磷脂和脂肪酸⁽¹³⁾，如下式所示：



PLA₂ 具有很多生物学功能，如作为神经毒素、肌肉毒素和心脏毒素，参与许多生理活动，如脂质消化和代谢、寄主防卫、信号传导以及炎症过程，从而引起国内外研究学者的广泛关注⁽¹⁴⁻¹⁵⁾。近年来发现 PLA₂ 是病毒感染的调节因子，还能通过磷脂酰肌醇和 G-蛋白产生细胞穿膜信号，现在 PLA₂ 在细胞信号传导方面的功能已成为当今比较活跃的研究领域⁽¹⁶⁻¹⁸⁾。

PLA₂ 广泛地存在自然界中，特别是哺乳动物胰腺和蛇中⁽¹⁹⁾。根据 PLA₂ 对钙离子的依赖性可分为两种类型：一种是钙离子依赖性磷

脂酶 A₂，一种是钙离子不依赖性磷脂酶 A₂ (iPLA₂)⁽²⁰⁾。按照 iPLA₂ 的生化特性可将其分为三类：溶酶体性或酸性 iPLA₂，刷状缘膜性 iPLA₂，细胞内 iPLA₂^(15, 21-25)。iPLA₂ 主要存在于脑、肺、心和肝组织以及巨噬细胞中。只有少数几种 iPLA₂ 已被纯化出来，但都还未完成氨基酸序列分析。钙离子依赖型磷脂酶 A₂ 根据分子量和细胞分布又分为两类：一类是低分子量 (10-14kDa) 的分泌型磷脂酶 A₂ (sPLA₂)，一类是与结构有关的高分子量 (85kDa) 的细胞内型磷脂酶 A₂ (cPLA₂)⁽²⁶⁾。来自细胞液和血小板的 sPLA₂ 涉及到炎症反应的发病机制。最近研究表明，sPLA₂ 在炎症过程中有双重作用：(1) 与磷脂酶有关的防护、消化功能，需要钙离子，主要作用于原核细胞；(2) 通过结合原生质膜受体的细胞信号功能，主要作用于真核细胞⁽²⁷⁻²⁸⁾。而 cPLA₂ 主要在信号转导过程中发挥作用⁽²⁹⁻³¹⁾。钙离子依赖型多数存在于胰腺和蜂毒液以及风湿性关节炎的滑液或一些细胞株中，而且具有特异的酶催化活性，而 iPLA 在组织中的含量极低，酶活性也缺乏特异性⁽³²⁾。

目前，国内 PLA₂ 的研究绝大部分是蛇 PLA₂ 的研究，而且这些酶大多数属于中温酶⁽³³⁻⁴⁰⁾。国外，蛇毒 PLA₂ 的克隆与表达、晶体结构模拟等都已详细报道，蜂毒 PLA₂ 的 DNA 重组及结构也进行了初步研究⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾；随着越来越多地 sPLA₂ 类型被发现，研究者已经进行了 sPLA₂ 的受体研究，以及不仅仅只限于催化功能研究⁽⁴⁶⁾；随着克隆和酶系性质的研究，开始对 cPLA₂ 进行功能性研究，如 cPLA₂ 选择性地从天然膜中释放花生四烯酸、与激素偶联等作用；对 iPLA₂ 已进行氨基酸序列分析和调控机制的研究。而嗜热 PLA₂，特别是古细菌嗜热 PLA₂ 的研究还处于初始阶段，到现在为止，只在 *Pyrococcus horikoshii* 中发现了嗜热 PLA₂ 的活力⁽⁴⁷⁾，但是由于其

分子结构的复杂性，还没有成功地构建表达嗜热 PLA₂ 的工程菌。基于古细菌的进化位置和嗜热 PLA₂ 的重要作用，使研究人员对嗜热 PLA₂ 格外关注。

5. 嗜热 PLA₂ 的应用前景

PLA₂ 是一种水解天然脂类的水解酶，它所产生的两种产物都是高强度的膜活性因子，他们相互作用于双分子脂膜结构，使红血球膜破裂、红细胞溶解，析出血红蛋白，产生溶血效应，所以 PLA₂ 被称为间接溶血毒。而且 PLA₂ 具有其他重要的生理意义，如作为神经毒素、肌肉毒素和心脏毒素，与炎症有关、对 MAPK（有丝分裂原激活的蛋白激酶）的活化作用、抗微生物活性、在组织损伤时出现、脱粒作用、与细胞有丝分裂有关⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾，所以它在医药、化工、农业等领域具有广阔的应用前景：

(1) 脱胶工序上的应用

在油脂深加工中，一道重要的工序就是脱胶。脱胶工序的目的是除去毛油中的胶体杂质，提高油脂质量，为后道加工工序打好基础。随着物理精炼技术的推广应用，脱胶技术显得尤其重要。可以说，脱胶效果的好坏直接影响蒸馏脱酸的产品质量。胶质中最主要的是磷脂，其中又分为可水化磷脂和非水化磷脂，可水化磷脂是比较容易除掉的，而非水化磷脂用直接水化法难以除去。新脱胶法都是针对这一点，用各种方式解决这一难题。

目前，我国所生产的高烹油或色拉油，其主要处理步骤为脱胶、脱酸、脱色和脱臭。当采用传统的方法生产食用油时如用碱炼的方法脱酸，胶质很容易形成稳定的乳化泡状物，结果造成不必要的浪费。在植物油中所存在的胶质主要由磷脂组成，磷脂的含量和其他组成由植物油的种类和萃取条件所决定。

无论是哪一种脱胶过程，其特点是纯物理方法或物理和化学结合的方法，这些方法不会都有效的适合于所有质量的毛油。另一方面，磷脂在活性植物细胞中扮演重要的结构物质和代谢物质，参与化学合成和分解过程。所以用 PLA_2 脱胶法，反应过程比较柔和，对磷脂的结构破坏程度比较小，且比其他脱胶方法节约成本近 20 美元/t，脱胶效果比其他方法理想。到目前为止，利用特殊的生化反应，例如酶催化水解磷脂分子，我国在这方面还没形成生产规模，只是停留在研究阶段⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾。

(2) 在蜂毒溶血肽开发中的应用

PLA_2 的存在给蜂毒溶血肽的分离纯化造成困难，使蜂毒溶血肽的蛋白质化学合成成本增加，蜂毒溶血肽的广泛应用受到限制。PL 的研究可以使蜂毒溶血肽开发成本降低，扩大蜂毒肽的应用领域⁽⁵²⁻⁵⁴⁾。

(3) 可作为工具酶

正是 PLA_2 这种相对简单的化学结构和复杂的药理生理功能之间的反差，使之成为血小板凝集分子机制、研究脂质代谢、脂蛋白代谢、生物膜磷脂结构以及脂-蛋白相互作用的结构和功能的重要工具酶，为研究遗传信息、基因诊疗等提供方便⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾。

(4) 医学药物上的应用

有降血压、引起惊厥、抑制血小板聚集、溶血、抗凝和诱导形成水肿等多方面的作用。近年来发现，由于 PLA_2 水解卵磷脂的产物不饱和脂肪酸是合成前列腺素的前体，与血栓的形成等生理效应有着密切的关系，所以它在治疗肿瘤、心血管疾病等病症的药物开发方面有着重要的应用前景，从而引起人们新的研究兴趣⁽⁵⁷⁻⁶⁰⁾。

第二章 APE 2325 的工程菌构建和表达

一. 材料和方法

1. 主要仪器

- (1) HZQ-X 振荡培养箱 黑龙江省东联电子技术开发有限公司
- (2) J2—21M 高速冷冻离心机 美国 Beckman 公司
- (3) 凝胶成像系统 (1442 MULTI-WAVELEI-VGTH FLUOROIMAGER) WALLAC ARTHUR 公司
- (4) 聚合酶链式反应器 Biometra 公司
- (5) 无菌操作台 苏州净化设备厂
- (6) DYY- II 2 型稳压温流电泳仪 北京市六一仪器厂

2. 主要试剂

限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶和 DNA 分子质量标准等购于 TaKaRa BioTECH Co.,Ltd(宝泰克生物科技公司)
凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于 QIAGEN 公司

PCR 引物合成和 DNA 测序由北京鼎国生物技术发展中心完成；
其他药品和试剂均为分析纯。

3. 试剂配制

TE 缓冲液 (pH : 8.0) : 含 1 mmol /L EDTA (pH : 8.0) 的 10 mmol/L Tris-Cl (pH : 8.0) 缓冲液；

STE 缓冲液: 含 1mmol/L EDTA (pH8.0) 和 0.1mol/L NaCl 的 10mmol/L Tris-Cl (pH : 8.0) 缓冲液；

TAE 缓冲液:0.04mol/L Tris-乙酸,0.001mol/L EDTA。

用于制备质粒的碱裂解缓冲液：

溶液 I : 50mmol/L 葡萄糖, 25mmol/L Tris ·Cl (pH :8.0), 10mmol/L EDTA, 在 6.895×10^4 Pa 高压下蒸气灭菌 15 分钟后, 保存于 4°C;

溶液 II : 0.2mol/L NaOH (从 2mol/L 贮存液中现用现稀释), 1% SDS (从 10%的贮存液中现用现稀释)

溶液 III: 5mol/L 乙酸钾 60ml, 冰乙酸 11.5ml, 水 28.5ml , 所配溶液中钾的浓度为 3mol/L , 乙酸根的浓度为 5mol/L。

4. 培养基成分

(1) 2YT 液体培养基 (%) : 胰化蛋白胨 1.6, 酵母抽提液 1, NaCl 0.5

1 N NaOH 调节 pH 值至 7.0, 15 lbf/in² (1.034*10⁵Pa) 灭菌 20 分钟。

(2) 2YT 固体培养基 (%) : 胰化蛋白胨 1.6, 酵母抽提液 1, NaCl 0.5, 琼脂粉 2

1 N NaOH 调节 pH 值至 7.0, 15 lbf/in² (1.034*10⁵Pa) 灭菌 20 分钟。

(3) 无菌氨苄青霉素溶液

100mg 氨苄青霉素溶于 1ml 无菌水。

(4) 无菌 IPTG 溶液的配制

0.238g IPTG 粉末, 定溶于 10ml 无菌水, 用 0.45 μm 滤器过滤除菌。

二. 实验方法

1. 提取 *Aeropyrum pernix* K₁ 染色体基因组

(1) 取 1.5ml 的 *Aeropyrum pernix* K₁ 培养物于 10,000rpm 离心 1 分钟, 倒尽上清液, 用 200 μl 溶液 I 重悬沉淀;

(2) 加入 50 μl 的 50mg/ml 溶菌酶, 在 4℃ 下消化 1 小时;

(3) 加入 1/2 体积的 2% 的 SDS 溶液反应 10 分钟;

(4) 加入等体积的酚:氯仿:异戊醇, 混匀, 离心 5 分钟, 将上清

液转移到另一支离心管中；

(5) 加入 2 倍体积的无水乙醇，沉淀菌体 DNA，12,000rpm 离心 5 分钟，倒去上清后，用 70%的乙醇洗涤；

(6) 倒置在滤纸上，晾干后用 TE 溶液重新溶解，备用。

2. PCR 扩增

以 *Aeropyrum pernix* K₁ 染色体基因组为模板，用含有 Nde I 位点的 N 端引物 P₁ 和含 BamH I 位点的 C 端引物 P₂ 扩增 APE 2325 片段，引物序列为：

P₁, 5' -TTTAGAATTCGCGCATATGGGTGTTAACGAGG-3' (N 端, 32bp)

P₂, 5' - TTTTGGTACCTTAGGATCCAATTAGTGTTCCTAGCCTCCG-3' (C 端, 38bp)

PCR 反应程序：

Pyrobest DNA Polymerase	0.5 μl
10×Pyrobest buffer	10 μl
dNTP Mixture	8 μl
primer1	1 μl
primer2	1 μl
模板	0.5 μl
ddH ₂ O	79 μl
100 μl	
94℃加热变性 2 分钟	
94℃加热变性 0.5 分钟	→反应进行 35 个循环
55℃退火 0.5 分钟	
72℃延伸反应 1 分钟	

3. 从琼脂糖凝胶中回收 DNA

应用鼎国技术公司 DNA 片段快速回收试剂盒。

操作方法见北京鼎国技术公司的产品使用说明书。

4. 感受态细胞的制备及转化

(1) 将甘油保藏的菌种 200 μ l 接种于装有 10ml LB 培养液的 50ml 试管中于 37°C 震荡 (250 rpm/min) 培养过夜。

(2) 向两个内装 200ml LB 培养液的 1 L 三角瓶中各加入 4ml 过夜培养细胞，于 37°C 下震荡培养至光密度 (OD_{600}) 值介于 0.5~0.6 之间 (约需 1~2 h)。

(3) 将每份细胞培养物分别倒入一个预先冰浴的无菌 250ml 离心瓶并置于冰上保持 20min。于 4°C 下离心 10min (8000rpm/min) (10000g)，弃上清。

(4) 将每份沉淀轻缓地悬于 100ml 冰冷的 0.1mol/L $MgCl_2$ (pH 7.2) 溶液中，按上述方法再次离心。

(5) 去上清，并将每一沉淀轻缓地悬浮于 20ml 冰冷的含 20% 甘油的 0.1 mol/L $CaCl_2$ (pH 7.2) 溶液中。

(6) 每管 1ml 分装于 40 个 1.5ml Eppendorf 管中，-80°C 冷冻贮存备用。

5. 质粒 DNA 的小量制备 (碱裂解法)

方法一

(1) 细菌培养物倒入 1.5ml 无菌微量离心管中，12000 转/分钟离心数秒，倒尽培养液。

(2) 加 400 μ l STE 溶液重悬，洗涤沉淀后，12000 转/分钟离心 30 秒，倒尽上清。

(3) 将细菌沉淀重悬于 90 μ l 用冰预冷的溶液 I 中，加 10 μ l 溶菌酶混匀，4°C 放置 1 小时。

(4) 加入 200 μl 溶液 II，盖紧管口，快速颠倒离心管数次，确保离心管的整个内表面均与溶液 II 接触，将离心管放置于冰水浴 5 分钟。

(5) 加入 150 μl 预冷的溶液 III，温和颠倒 4-6 次，冰浴 3-5 分钟，12000 转/分离心 5 分钟，上清移至另一无菌离心管。

(6) 加等体积的酚：氯仿：异戊醇，振荡混匀，12000 转/分离心，上清移至另一无菌离心管。

(7) 用 2 倍体积预冷乙醇沉淀 DNA，12000 转/分离心 5 分钟，沉淀用 70%乙醇洗两次，干后用 TE 溶解备用。

方法二

(1) 应用鼎国技术公司质粒快速提取试剂盒

(2) 操作方法见北京鼎国技术公司的产品使用说明书。(注：在加入 200 μl B 液后先加入 10 μl 溶菌酶，4°C 消化 1 小时，再加 RnaseA 操作，其余同说明书。)

6. 体外重组

(1) PCR 纯化产物的双酶切

在 1.5ml Eppendorf 管中，加入：

Buffer 10 $\times$ K	2 μl
BamH I	1 μl
Nde I	1 μl
PCR 纯化产物	12 μl
DdH ₂ O	4 μl
20 μl	

在 37°C 保温 1 小时。

(2) 质粒的双酶切

在 1.5ml Eppendorf 管中，加入：

Buffer 10×K	2 μl
BamH I	1 μl
Nde I	1 μl
质粒	10 μl
DdH ₂ O	6 μl
20 μl	

在 37℃保温 1 小时。

7. 质粒与 PCR 纯化产物的连接

T ₄ DNA Ligase	1 μl
Buffer	1 μl
质粒	1 μl
PCR 纯化产物	5 μl
DdH ₂ O	2 μl
10 μl	

16℃水浴过夜。

8. 工程菌 APE 2325

挑取经酶切鉴定的转化菌，分别置 5 ml 含氨苄培养液中，37℃振荡培养过夜，次日稀释 10 倍，继续培养 2 h ($A_{600}=0.6\sim 1$) 时，将菌液分装入两个试管中，其中一管作为诱导的阴性对照，而另一管加入异丙基硫代 β -D-半乳糖苷 (IPTG)，终浓度为 1 mmol/L，继续培养 4 h，离心 (6000 g, 4℃, 15 min)，所得菌体经冻融法处理后，进行 12% SDS-PAGE，鉴定表达的阳性克隆。

三. 结果和讨论

1. APE 2325 克隆、酶解分析和序列鉴定

用具有高保真的PCR扩增用的DNA聚合酶,以古细菌 *Aeropyrum pernix* K₁ 染色体基因组为模板进行 APE 2325 的扩增 (PCR 反应条件: 94°C 2 min 对模板进行变性, 在 94°C 1 min, 55°C 1.5 min, 72°C 2 min 35 个循环), 扩增产物经 2%琼脂糖电泳分析, 于 470bp 左右处出现一条特异带, 大小与预期 474bp 相符 (图 2-1)。

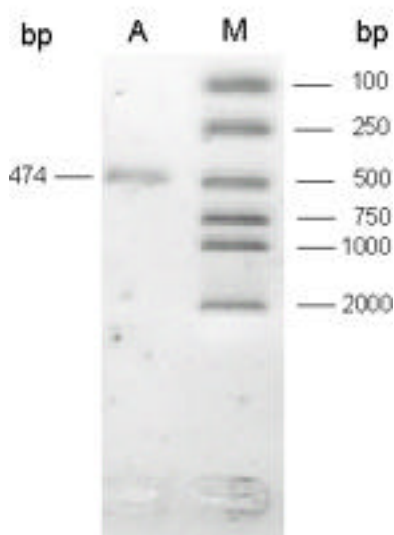


Fig.2-1 PCR amplification of APE2325 gene

A: PCR product of APE2325 gene; M: DL2000 Marker

将预期大小 474bp 的产物经凝胶回收试剂盒回收后,与 pET15b 载体连接,转化感受态大肠杆菌 BLP,涂布于氨苄 2YT 平板上,挑取单克隆提取质粒,用 Nde I 和 BamH I 双酶切鉴定,结果为阳性克隆。如图 (2-2) 所示,酶切片段大小分别为大片段 (pET15b) 5700bp 左右和小片段 (APE2325) 470bp 左右。

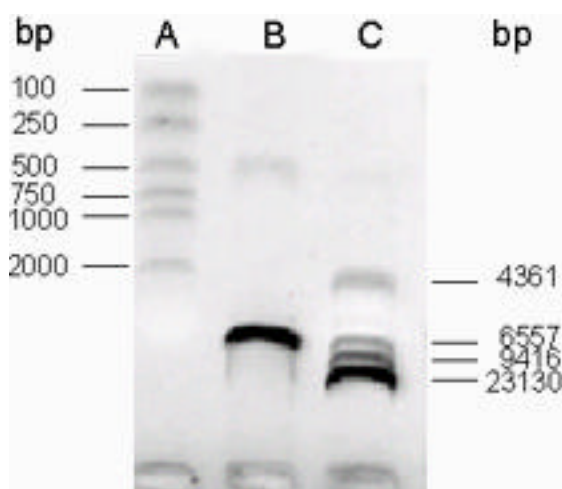


Fig.2-2 Restriction enzyme digested of the recombinant plasmid pET15b-APE2325

A, DL2000 Marker; B, Colony of pET15b-APE2325 digested with Nde I / BamH I ; C, λ Hind III Marker

选取酶切鉴定正确的克隆质粒送交北京鼎国生物技术的发展中心进行序列测定,结果表明:克隆的 APE 2325 基因序列与 GeneBank 中已公布的序列完全一致(测序资料略)。

2. 12% SDS-PAGE

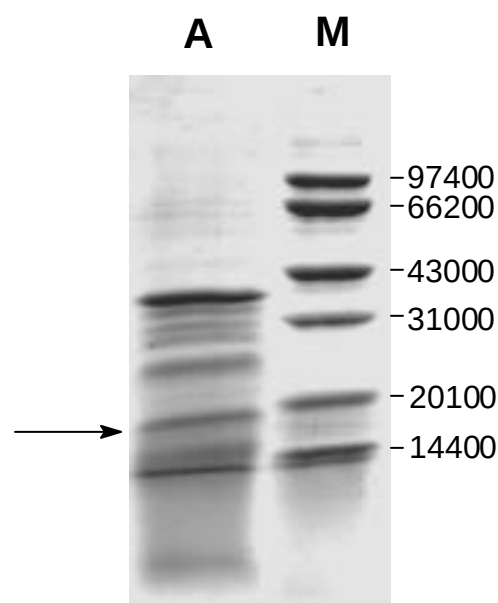


Fig 2-3 12% SDS-PAGE of APE 2325.A, the expression products of recombinant plasmid of induced with IPTG; M, protein marker.

如图 2—3 所示，在 18000Da 左右出现了与预期相符的电泳条带，因此可以说明是酶 APE 2325 表达的阳性克隆。

四．小结

随着科学技术的发展，DNA 重组技术和蛋白质工程的成功应用使酶的应用能与完备的化学技术竞争。与化学技术相比，酶促反应具有高产量、高纯度和酶的普遍稳定性等优点。尽管目前研究的磷脂酶 A₂ 种类很多，绝大多数来自哺乳动物胰腺和蛇，但大部分都是中温酶，在应用上有一定的局限性，这就使嗜热磷脂酶 A₂ 的研究迫在眉睫。

由于嗜热菌生长速度较低，培养条件严格，因此通过培养野生菌来获得大量嗜热酶是极其困难的。随着基因工程技术的发展，人们可以把嗜热菌中的目的基因在中温宿主中表达，这样就能在温和的培养条件下得到大量的嗜热酶。本章主要以构建稳定的、易于培养的、易于纯化的磷脂酶 A₂ 为目的。

我们把 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站上预测具有 PLA₂ 结构域的 APE 2325 基因进行 PCR 克隆，与 pET15b 载体连接，转化感受态大肠杆菌 BLP 中，涂布于氨苄 2YT 平板上，挑取单克隆提取质粒，用 Nde I 和 BamH I 双酶切鉴定，结果为阳性克隆。将阳性克隆进行 12% SDS-PAGE 电泳，结果与预期相符，进一步鉴定了所获得的 APE 2325 工程菌。至此，我们成功地构建了嗜热酶 APE 2325 工程菌。

第三章 嗜热酶 APE 2325 的纯化

一. 材料和方法

1. 主要仪器及试剂

- (1) UV—250 紫外可见分光光度计购于日本岛津公司
- (2) 胰化蛋白胨、酵母抽提液购于英国 OXOID 公司
- (3) Tris 碱、异丙基硫代 β -D-半乳糖苷 (IPTG) 购于美国
Bebco Industries Corp 公司
- (4) 氨苄青霉素、丙烯酰胺、N, N' — 亚甲双丙烯酰胺、
N,N,N,N' — 四甲基乙二胺、十二烷基硫酸钠购于美国 Sigma 公司
- (5) SDS-PAGE Molecular Weight Markers for Proteins (低
分子量标准蛋白质分子量 14,400-97,400) 购于中科院上海生物化学研究所
- (6) 镍亲和柱购于德国 Novagen 公司
- (7) Phoretix 1D Advanced 4.01 软件购于 PerkinElmer Life
Sciences 公司

2. 工程菌来源

本室构建的以 pET15b 为载体, 大肠杆菌 BLP 为宿主高效表达体系的产嗜热磷脂酶 A₂ 的工程菌, pET15b 含有七个组氨酸尾巴和凝血酶切位点, 简化了酶表达后的重组酶纯化流程。

3. 培养基成分

- (1) 2YT 液体培养基 (%) : 胰化蛋白胨 1.6, 酵母抽提液 1,
NaCl 0.5
1 N NaOH 调节 pH 值至 7.0, 15 lbf/in² (1.034*10⁵Pa) 灭菌
20 分钟。
- (2) 2YT 固体培养基 (%) : 胰化蛋白胨 1.6, 酵母抽提液 1,
NaCl 0.5, 琼脂粉 2

1 N NaOH 调节 pH 值至 7.0, 15 lbf/in² (1.034*10⁵Pa) 灭菌 20 分钟。

(3) 无菌氨苄青霉素溶液

100mg 氨苄青霉素溶于 1ml 无菌水。

(4) 无菌 IPTG 溶液的配制

0.238g IPTG 粉末, 定溶于 10ml 无菌水, 用 0.45 μm 滤器过滤除菌。

4. 亲和层析溶液

(1) 8x Binding Buffer

40M 咪唑、

4M NaCl、

160mM Tris-HCl (pH 7.9)

(2) 4x Elute Buffer

4M 咪唑

2M NaCl

80mM Tris-HCl (pH 7.9)

(3) 8x Charge Buffer

400mM Ni₂S04

(4) 4x Strip Buffer

2M NaCl

80mM Tris-HCl (pH 7.9)

400mM EDTA

二. 实验方法

1. APE 2325 工程菌的复壮及种子培养

涂布保存于 10% 甘油管的种子液于固体平板上进行复壮, 挑

取一环新鲜的复壮后的工程菌，接入 2ml 液体种子培养基中，37 °C 120rpm/min 条件下，空气摇床培养 12 小时，作为初步放大的种子液。

2. 工程菌发酵的初步放大

将 2ml 种子液注入到 200ml 的液体发酵液中，37 °C 120rpm/min 条件下，空气摇床培养 12 小时，作为大批培养的种子液。

3. 工程菌大批发酵及目的蛋白的诱导

将初步放大的种子液以 1%的比例接入 6 L 的培养液中，37 °C 120rpm/min 条件下空气摇床培养，待菌体生长到对数期时（OD=0.6~1 ）加入 100mM 的 IPTG 的终浓度达到 1 mM，并降低摇床的温度为 25°C，对菌体进行诱导使其产生大量的目的蛋白，同时避免产生酶的包涵体，培养 10-12 小时后收获菌体。

4. APE 2325 的纯化流程图

(1) 粗酶液的获得

工程菌培养液

↓

离心 6000rpm，20 分钟（称湿重）

↓

弃去上清

↓

将菌体于-30°C冷冻 1 小时

↓

溶菌体于 binding buffer 中

↓

超声破碎 10 分钟

↓

85°C水浴，30 分钟加热变性其他菌体蛋白及激活目的蛋白

↓

12000rpm 离心 20min 收集上清得粗酶液

(检测蛋白浓度及粗酶活力)

(2) 亲和柱层析

3ml 镍亲和柱 (Ni-Chelating Column) 加入去离子水至柱顶端，自然洗脱后用 5 倍体积的 1×Charge buffer 自然洗脱，再加入去离子水至柱顶端自然洗脱，后用 3 倍柱体积 1×Binding buffer 自然流干，再将粗酶液上柱，待自然流干后用 11.2 倍柱体积的 Binding buffer 自然洗脱。最后用 5 倍柱体积的 1×Wash buffer 洗脱目的蛋白 用 1×Binding buffer 透析蛋白溶液除去咪唑，用聚乙二醇包埋浓缩目的蛋白，电泳检测纯度。

5. SDS-PAGE

SDS-PAGE 在 Phamacia Electrophoreis EPS 500 / 400 型电泳仪上进行。

(1) 凝胶的配制：如表 3-1 所示。

(2) 2X 凝胶加样缓冲液的配制

50mmol/L Tris - Cl (pH6.8) ; 100mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT) ;
2% SDS (电泳级) ; 0.1% 溴酚蓝 ; 10% 甘油。

(3) Tris - 甘氨酸电泳缓冲液的配制

25mmol/L Tris ; 250mmol/L 甘氨酸 (pH8.3) ; 0.1% SDS。

(4) 染色液的配制

配制 90ml 乙醇：水 (1：1, V/V) 和 10ml 冰乙酸的混合液，

溶解 0.25g 考马斯亮蓝 R250，用滤纸过滤去除颗粒状物质。

(5) 脱色液的配制

90ml 乙醇：水（1：1，V/V）和 10ml 冰乙酸的混合即可。

脱色 30 min 换一次洗脱液，直至胶的背底变为无色为止。

参见《分子克隆》第二版 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳
(p880-890)

Table 3-1

溶液成分	分离胶 12%	浓缩胶 5%
	配制体积(4ml)	配制体积 (2ml)
H ₂ O	1.3	1.4
30%丙烯酰胺溶液	1.6	0.33
1.5mol/LTris(pH8.8)	1.1	-
1.0mol/LTris(pH6.8)	-	0.25
10%SDS	0.04	0.02
10%过硫酸胺	0.04	0.02
TEMED	0.004	0.005

6. 酶活测定

(1) APE 2325 磷脂酶 A₂ 活力测定方法⁽⁴⁷⁾

1) 反应

20 μl 0.1mg/ml NBD-PC 用氮气吹干，加入 1ml 用 90℃保温的 pH 值为 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 的缓冲液和适量酶液，90℃反应 1 小时，放置冰浴中结束反应。

2) 萃取

将 3ml 乙酸乙酯/丙酮（2：1，v：v）加入到上述反应液中

↓ 振摇均匀

2600rpm,4℃离心 10 分钟

↓

收集 2.5ml 上清液

↓

氮气干燥

↓

溶于 150 μl 甲醇/氯仿（1：1，v：v）

3) 薄层层析

取 10 μl 样品点在薄板上，自然干燥，然后用氯仿/甲醇/水（35：65：4，v：v：v）作为展层剂，分离 NBD-PC 和 NBD-acid。

(2) 酯酶活力测定方法⁽⁶¹⁾

按表（3-2），以 10 mmol/L 对硝基苯丙酸酯作为底物，取 940 μl 经 90℃保温的 pH 值为 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 的缓冲液，加入 40 μl 纯化的 APE 2325，再加入 20 μl 底物测对硝基苯酚在 420 nm OD 值随时间的变化曲线。

Table 3-2

反应步骤	空白	样品
加入保温的 pH8.0Tris-HCl 缓冲液	980 μl	960 μl
加入对硝基苯丙酸酯	20 μl	20 μl
加入酶液	— —	40 μl
总体积	1ml	1ml

活力计算方法：

活力单位 / mg = Δ OD₄₂₀ / 0.016 × V / V_E × [E]

OD₄₂₀：每分钟△OD₄₂₀ 的变化

V：反应体系的总体积（ml）

V_E：酶在反应体系中的体积

[E]：酶浓度（mg / ml）

$\epsilon_{420} = 1 / 0.016 \mu M$

(3) APE 2325 活力单位定义

在上述反应条件下，每分钟催化 1 微摩尔对硝基苯丙酸酯所需的酶量代表为一个活力单位（U）。

7. 蛋白质浓度的测定

按 Bradford 方法测定蛋白含量，用牛血清白蛋白（BSA）做标准曲线⁽⁶²⁾。考马斯亮兰法：以牛血清白蛋白配置标准蛋白溶液（1mg / ml）绘制标准曲线，测定目的蛋白含量。

Table 3-3

Binding buffer 缓冲液	100 μl	95 μl	90 μl	80 μl	70 μl	60 μl	50 μl	40 μl
考 马 斯 亮 兰 溶 液	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
标 准 蛋 白 溶 液	— —	5 μl	10 μ l	20 μ l	30 μ l	40 μ l	50 μ l	60 μ l

(1) 考马斯亮兰溶液配制：考马斯亮蓝 G -250 100mg 溶于 50ml 95%乙醇中，加入 100ml85%磷酸，用蒸馏水稀释至 1000 ml，滤纸过滤。最终试剂中含 0.01%（W/V）考马斯亮蓝 G -250，4.7%（W/V）乙醇，8.5%（W/V）磷酸。

(2) 绘制标准曲线：如表 3-3 所示。

三. 结果与讨论

1. 酶纯化活力回收情况

由于表达产物带有 His-tag 标记，所以易于通过 Ni-螯合柱获得纯化的 APE 2325 蛋白；同时由纯化回收率及纯化倍数可知，热变性与 Ni-亲和柱层析均为非常有效的纯化目的蛋白的方式（表 3-4）。将酶切鉴定的工程菌经 IPTG 诱导后，在 SDS-PAGE 电泳中出现一条明显的蛋白表达带，其分子量约为 18000Da 左右（图 3-1），与预期值 17871Da(APE 2325)+七个组氨酸尾巴和凝血酶切位点基本相符。

用 Phoretix 1D Advanced 4.01 一维图像分析软件可以得出其精确分子量为 18286Da,其预期值相符（如图 3-2 所示）。

Table 3-4 Purification of APE2325

提纯步骤	总活力 (U)	总蛋白量 (mg)	比活力 (U/mg 蛋白)	回收率 (%)	提纯倍数 (%)
冻融后的					
粗酶液	2103	1087	1.93	100	1
镍亲和柱	1633	13.61	119.97	83.6	62.16

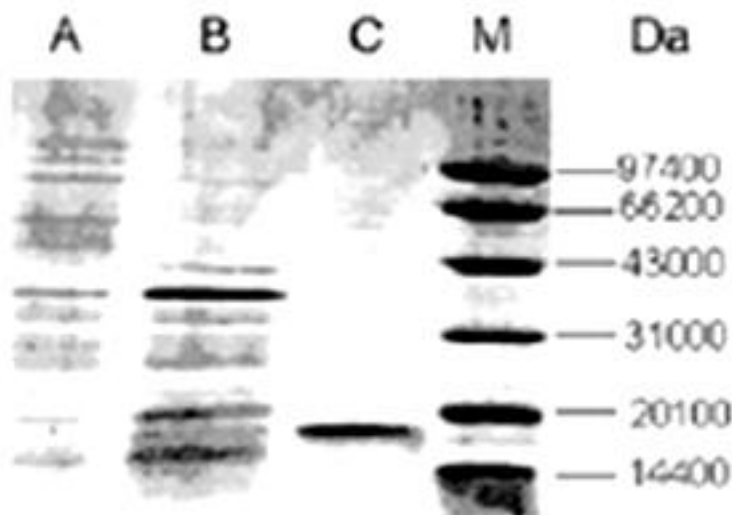


Fig.3-1 SDS-PAGE analysis of the expression products of recombinant APE 2325 in BLP

M, protein marker; A, the uninduced expression products of pET15b-APE2325; B, the expression products of recombinant plasmid of induced with IPTG; C, the purified recombinant protein

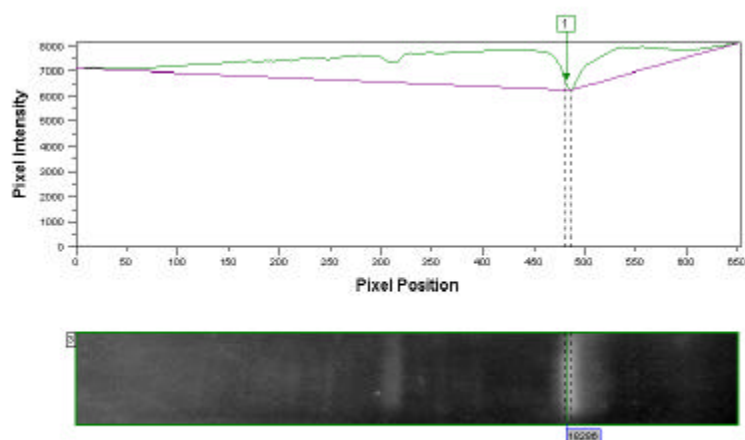


Fig 3-2 Phoretix 1D Advanced 4.01 analysis of APE 2325.

四. 小结

酶产生于菌体中, 酶所处的微环境直接影响酶的理化性质及催

化性质。为深入探讨酶的特性、结构与功能关系，必须排除其它因素对酶活性的干扰，使酶从产生的环境中分离提取出来，所获得的酶纯度越高，其性质与结构的研究就越准确，就更利于进行理论应用的研究。

本章研究了工程菌重组酶 APE 2325 的纯化，通过有效的纯化方法、热变性及镍亲和柱层析等纯化方法，使重组酶 APE 2325 得到纯化。经 SDS-PAGE 电泳分析，在分子量为 18000Da 左右出现电泳条带，与预期值 17871Da(APE 2325)+七个组氨酸尾巴和凝血酶切位点基本相符，并只存在单一电泳条带，表明此酶已被纯化。用 Phoretix 1D Advanced 4.01 一维图像分析软件可以得出其精确分子量为 18286Da,与预期值相符。

第四章 APE 2325 的酶学性质研究

一. 实验材料

1. APE 2325 来源

由本组构建的工程菌表达，经纯化后获得。

2. 实验仪器

UV—557 紫外可见分光光度计、荧光分光光度计 RF-5301PC 购于日本 SHIMADZU（岛津）公司

凝胶成像系统购于（1442 MULTI-WAVELEI- VGTH FLUOROIMAGER）购于 WALLAC ARTHUR

Phoretix 1D Advanced 4.01, Phoretix 2D Advanced 5.01 等软件购于 PerkinElmer Life Sciences 公司

3. 实验试剂

对硝基苯酚丙酸酯 (p-NITROPHENYL PROPIONATE), 对硝基苯酚辛酸酯 (p-NITROPHENYL CAPRYLATE), 对硝基苯酚月桂酸酯 (p-NITROPHENYL LAURATE), 对硝基苯酚棕榈酸酯 (p-NITROPHENYL PALMITATE), 对硝基苯酚硬酸酯 (p-NITROPHENYL STEARATE), 1-acyl-2-(N-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) aminocaproyl phosphatidylcholine (NBD-PC), 购于 Sigma 试剂公司

甲醇、乙腈、氯仿购于北京化工厂

乙酸乙酯、丙酮购于天津天泰精细化学品有限公司

二. 实验方法

1. 如不特殊说明, 测酶活方法同前。

2. APE 2325 的底物特异性

分别称取适量的 p-NITROPHENYL PROPIONATE、p-NITROPHENYL CAPRYLATE、p-NITROPHENYL LAURATE、p-NITROPHENYL PALMITATE 和 p-NITROPHENYL STEARATE 溶于乙腈配成 10mmol/L 的底物溶液, 进行酶活测定。

3. APE 2325 最适温度的测定

以 NBD-PC 作为反应底物, 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 作为溶剂, 然后在 50°C-100°C 的温度范围内测定该酶的 PLA₂ 活力。

以对硝基苯酚丙酸酯作为反应底物, 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 作为溶剂, 然后在 40°C-100°C 的温度范围内测定该酶的酯酶活力。

4. APE 2325 最适 pH 的测定

配置 50 mM 的不同 pH 的缓冲液, 包括 pH 5.0-7.0 的磷酸缓冲液, pH 7.5-8.8 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 9.0-11.0 的 Gly-NaOH 缓冲液, 在不同缓冲体系中测定 APE 2325 的反应活力。

5. APE 2325 热稳定性

取相同酶浓度置于不同温度（50℃-100℃）下保温，每 20 分钟检测一次酶的残余活力，取出的酶迅速放于冰浴中降低温度将酶构象固定，以免缓慢降温时酶复性，干扰稳定性的检测结果。

6. APE 2325 pH 稳定性

将 APE 2325 酶液放置于 50 mM 不同 pH 的缓冲液(pH 5 – 10.5) 中，在室温放置 24 小时，测其残余活力。

7. APE 2325 动力学常数

我们采用 Lineweaver-Burk 作图法： $1/V-1/[S]$ 作图，求取酶 APE 2325 的动力学参数。测定动力学常数时，选择合适的酶浓度，使反应体系处于最适环境，即取 940 μ l 经 90℃保温的 pH 值为 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 的缓冲液，加入 40 μ l 纯化的 APE 2325，再加入不同浓度的底物（25-200 μ M）测对硝基苯酚在 420 nm OD 值随时间的变化曲线。

8. 金属离子对酶活的影响

将酶液与各种一定浓度的金属离子混合在酶的最适反应温度下保温 60 分钟，然后取样测定其残余酶活力。

9. APE 2325 的光谱学性质

将样品于不同温度下保温（50-100℃）10 分钟后，通过荧光分光光度计来进行发射光谱扫描,即在 295nm 激发波长下对酶在 350-450nm 波长范围内进行扫描。

同时还检测了不同温度下荧光强度的时间进程曲线，即固定激发波长为 295nm，发射波长为 385nm 时，对酶进行时间扫描，获得了不同温度下酶构象变化的时间进程曲线⁽⁶³⁾。

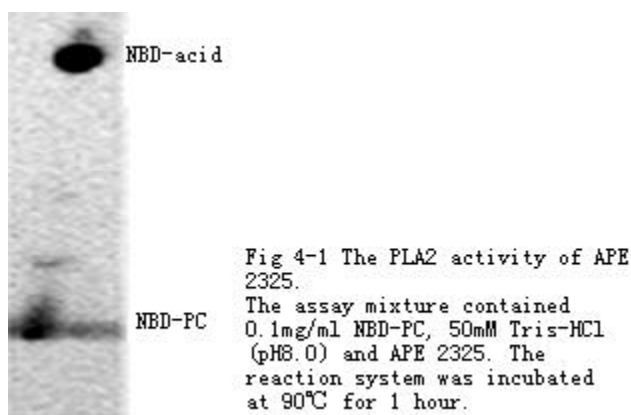
三. 结果与讨论

1. APE 2325 的 PLA₂ 活性

PLA₂ 能很好的溶于水溶液中, 与许多酶不同的是 PLA₂ 酶解的是脂溶性物质, 即主要催化的是非均相反应。酶对形成脂微团、单层和双层膜脂的底物所表现的活力比溶液中分散存在的底物大得多; 而且在催化反应上存在一个延滞期, 即反应速度开始很慢, 经过一段时间后, 活力才突然上升。我们应用 NBD 荧光标记的 PC (NBD-PC) 作为底物, 水溶性较好, 延滞期减缓, 有利于 APE 2325 PLA₂ 活性的检测。

(1) APE 2325 的 PLA₂ 活性检验

如图 4-1 所示, APE 2325 作用于 NBD-PC 生成 NBD 酸, 可见 APE 2325 具有 PLA₂ 活性。



(2) 标准曲线

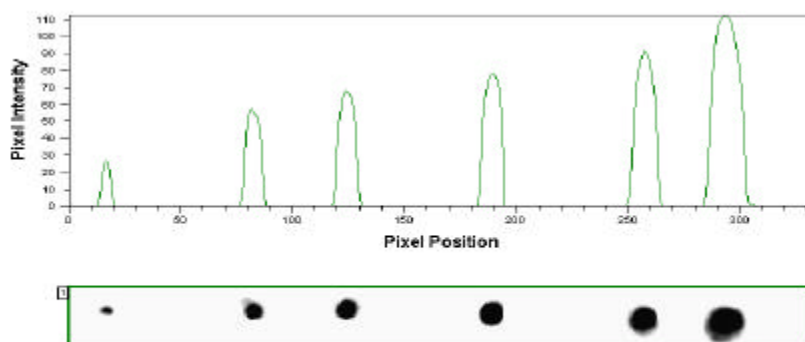


Fig 4-2 Calibration curve. The system contained NBD-PC of different quantity as standards, and were detected by using Arthur Imager(a multi-wavelength fluoro-imager). Analysis was determined by Phoretix 1D Advanced 4.01 and Phoretix 2D Advanced 5.01 softs.

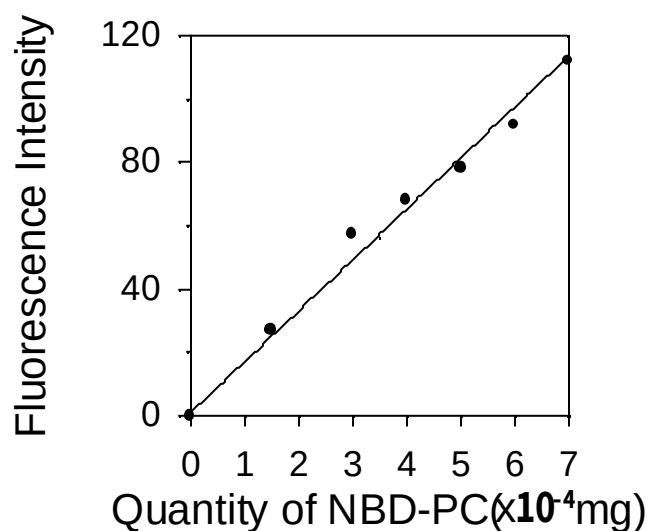


Fig 4 -2 ' Calibration curve. The system contained NBD-PC of different quantity as standards, and were detected by using Arthur Imager(a multi-wavelength fluoro-imager). Analysis was determined by Phoretix 1D Advanced 4.01 and Phoretix 2D Advanced 5.01 softs.

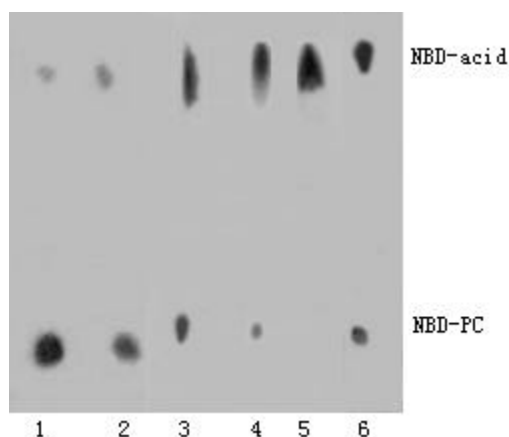


Fig 4-3 Effect of temperature on the PLA₂ activity of APE 2325. The assay mixture contained 0.1mg/ml NBD-PC, 50mM Tris-HCl (pH 8.0) and APE 2325. 1-6, the reaction system was incubated at 50°C-100°C for 60 min respectively. The products were separated by silica gel thin-layer chromatography by using chloroform/methanol/water(35:65:4, by vol) and detected by Arthur Imager. The positions of NBD-PC and NBD-acid were indicated.

(3) APE 2325 最适反应温度

反应温度是影响酶催化活力的重要因素,尤其是嗜热酶嗜热酶在高温下的反应活力远远高于低温。以 NBD-PC 作为反应底物, pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液作为溶剂,然后在 50°C-100°C 的温度范围内测定该酶的比活,结果如图 4-3,图 4-4 所示:其最适温度为 90°C。

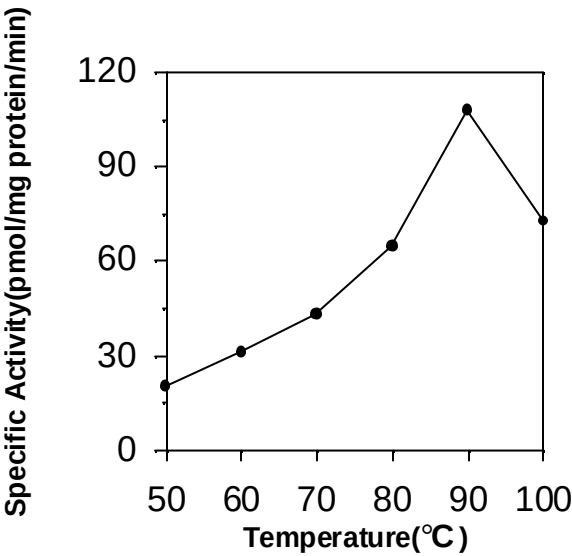


Fig 4-4 Effect of temperature on the PLA₂ activity of APE 2325. The assay mixture contained 0.1mg/ml NBD-PC, 50mM Tris-HCl (pH8.0) and APE 2325. The reaction system was incubated at 50 °C -100 °C for 60 min respectively.

2. APE 2325 的酯酶活性

(1) APE 2325 的底物特异性

研究 APE 2325 的最适底物，有助于将 APE 2325 应用于合适的领域。

Table 4-1 Effect of substrates on the esterase activity of APE 2325

Substrates	Relative activity (%)
p-NITROPHENYL PROPIONATE	100
p-NITROPHENYL CAPRYLATE	79.5
p-NITROPHENYLL LAURATE	23.7
p-NITROPHENYL PALMITATE	0
p-NITROPHENYL STEARATE	0

由表 4-1 可知，APE 2325 在对硝基苯酚软脂酸酯、对硝基苯

酚月桂酸酯作为底物时几乎无活力，在对硝基苯酚辛酸酯、对硝基苯酚硬酸酯作为底物时有部分活力，在对硝基苯酚丙酸酯作为底物时有最高活力。

(2) APE 2325 最适反应温度

反应温度是影响酶催化活力的重要因素，尤其是嗜热酶，嗜热酶在高温下的反应活力远远高于低温。我们考察了 APE 2325 在 pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中不同温度对酶活力的影响。由于此酶为嗜热性酶，同时考虑底物的稳定性，所以活力检测的最高温度仅为 100℃。以对硝基苯酚丙酸酯作为反应底物，pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液作为溶剂，然后在 40℃-100℃ 的温度范围内测定该酶的比活，结果如图 4-5 所示。

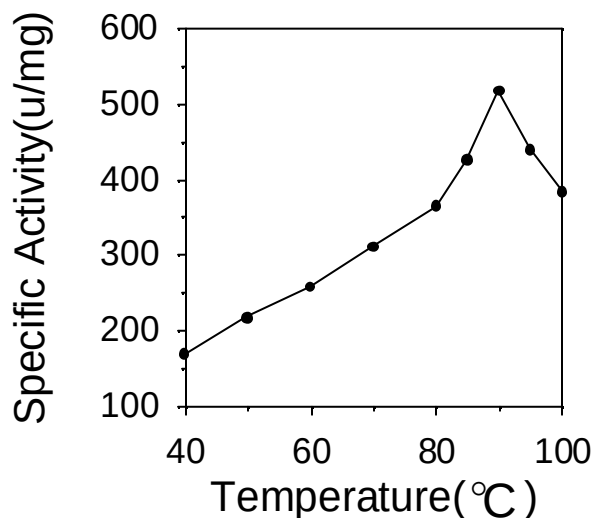


Fig 4-5 Effect of temperature on the esterase activity of APE 2325. The assay mixture contained 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM p-NITROPHENYL PROPIONATE and APE 2325. The reaction system was incubated at 50℃ -100℃ for 5 min respectively.

从图 4-5 可以看出，该酶对温度的变化很敏感，在 80-100℃

之间均具有较高的催化活力，当温度达到 90℃时，该酶表现出最大催化活力。所以 APE 2325 的最适反应温度为 90℃。同时可以看到，65℃左右时，酶活力为最高活力的一半，50℃时酶活力为最高活力的 40%，100℃时酶活力为最高活力的 80%，由此可见该酶为极端的嗜热酶。

(3) APE 2325 的最适 pH

环境的 pH 值影响酶分子中带电氨基酸解离状态，所以不同的 pH 影响酶的构象，从而影响酶的催化活力。以对硝基苯酚丙酸酯作为底物，测定 APE 2325 在 pH4-8.8 范围内的比活，以 pH 为横坐标，比活为纵坐标作图，结果如图 4-6 所示。结果表明，该酶的最适 pH 为 8.0。由于底物的自分解，因此无法准确检测高于 pH 为 9.0 酶的催化活力。

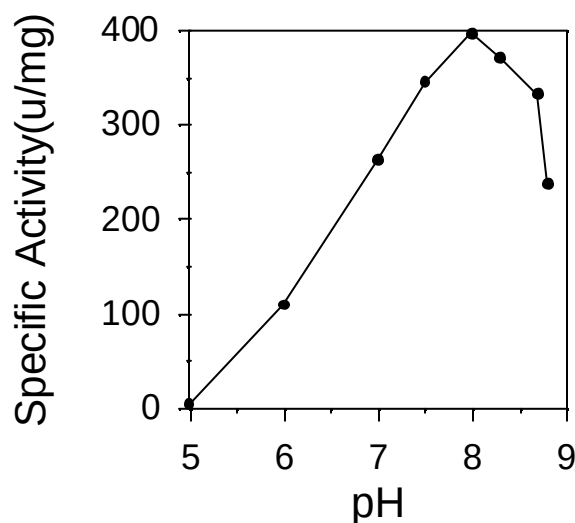


Fig 4-6 Effect of pH on the esterase activity of APE 2325. The assay mixture contained 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM p-NITROPHENYL PROPIONATE and APE 2325. The reaction system was incubated at 90℃ for 5 min at different pH.

(4) APE 2325 的热稳定性

由于此酶基因来自于嗜热古细菌,所以此酶应具有极高的热稳定性。酶的热稳定性是嗜热酶最显著的特性,体现了嗜热酶对极端环境的适应的机制。将纯酶置于不同温度(50℃-100℃)下保温一定时间后迅速冷却,然后测定其残留的酶活力,结果如图 4-7 所示。

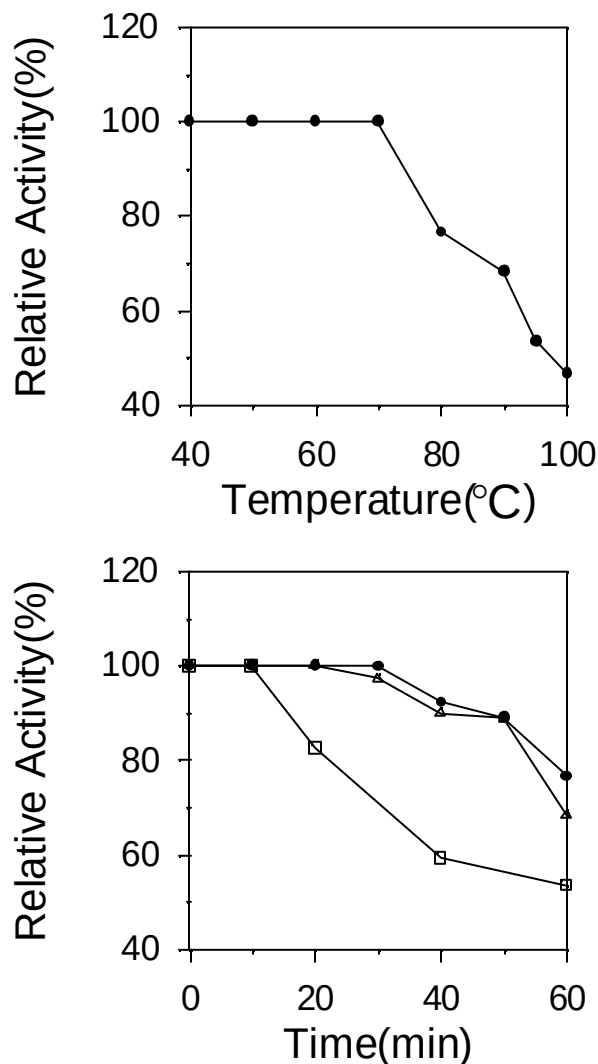


Fig 4-7 Thermostability of APE 2325. ● APE 2325 was incubated at 80 °C; △ APE 2325 was incubated at 90 °C; □ APE 2325 was incubated at 95 °C. The assay mixture contained 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM

p-NITROPHENYL PROPIONATE and APE 2325, then was reacted at 90°C for 5 min. Aliquots were removed to determine the remaining activity.

结果表明, APE 2325 在 80°C 保温 1h 后, 酶活力还剩 76.64%; 在 90°C 保温 1h 后, 酶活力还剩 68.23%; 在 95°C 保温 1h 后, 酶活力还剩 53.56%, 说明该酶的热稳定性较高。

(5) APE 2325 pH 稳定性

由图 4-8 可以看出, APE 2325 在碱性 (pH7-9) 范围内稳定性较高, 残余酶活在 70% 以上。

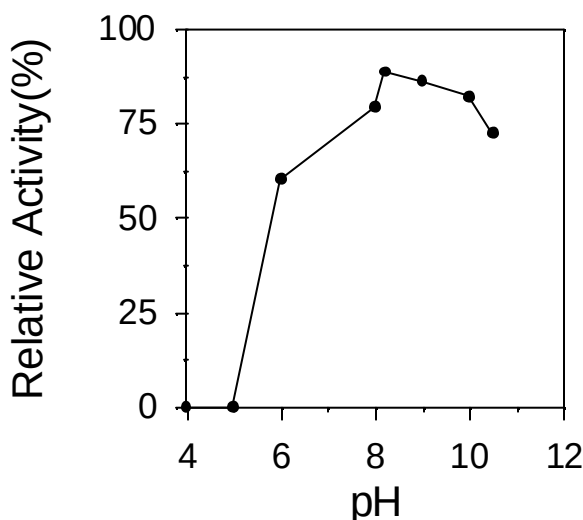


Fig 4-8 pH stability of APE 2325. APE 2325 was incubated at different pH at the room temperature for 24 hour. The assay mixture contained 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM p-NITROPHENYL PROPIONATE and APE 2325, then was reacted at 90°C for 5 min. Aliquots were removed to determine the remaining activity.

(6) APE 2325 的动力学常数

在酶的研究应用中,人们经常会遇到底物浓度对酶反应速度的影响问题, Michaelis 和 Menten 得到了一个表示底物浓度与反应速度之间相互的关系的方程式,称为米氏方程式。米氏方程不仅给

出了酶反应的速度和酶浓度、底物浓度的关系，而且还给出了一个非常重要的物理常数—米氏常数 K_m 。米氏常数 K_m 等于酶反应速度达到最大反应速度一半时的底物浓度。

K_m 值是酶的特征常数之一，只与酶的性质有关，而与酶浓度无关，和 pH、温度等其他因素无关。如果酶有几种底物，则对每一种底物都各有一个特定的 K_m 值。同一种酶有几种底物就有几个 K_m 值，其中 K_m 值最小的底物一般称为该酶的最适底物或底物，由此可以帮助判断酶的专一性，并有助于研究酶的活性中心结构。

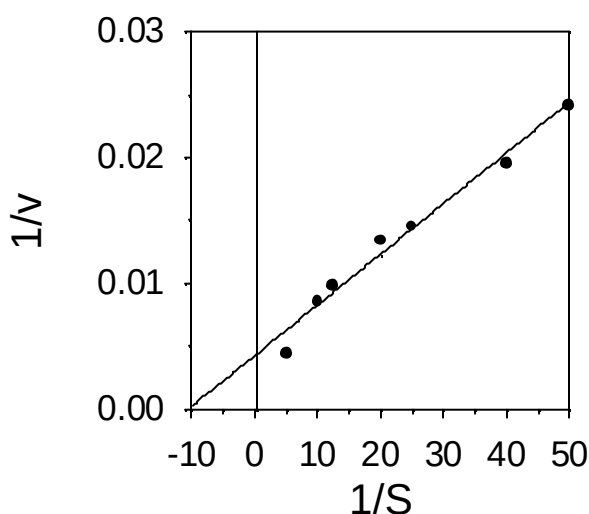


Fig 4-9 The determination of kinetic parameters. The assay mixture contained 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM p-NITROPHENYL PROPIONATE and APE 2325. The reaction system was incubated at 90°C for 5 min.

当一种底物大过量时，此酶的动力学行为基本类似于米氏酶，所以利用米氏方程，采用双倒数法，来计算酶的动力学常数。在变化底物浓度的条件下，测定反应的初速度，得出反应的动力学常数，结果见图 4-9。由两轴上的截距获得 K_m 值与 V_{max} ，再由 $V_{max}=k_{cat}*[E]$ 计算出 k_{cat} ，酶的分子量以 17871Da 计算，所得的动力学常数如下：

$K_m=103.3\mu M$ ， $V_m=249.69u/mg$ ， $k_{cat}=39.04s^{-1}$ 。

(7) 金属离子对酶活的影响

测试了 5 种无机离子 (Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+}) 在浓度分别为 $1mmol/L$ 时对酶活力的影响,表 4-2 结果表明各种均无明显的激活作用。除 Zn^{2+} 对酶有较强的抑制作用外,其余离子未见明显的抑制作用。

Table 4-2 Effects of different metal cations.

Metal cations	Specific activity (u/mg)	Relative activity (%)
Blank	171.89	100
Na^+	100.58	58.51
K^+	135.58	78.88
Ca^{2+}	141.28	82.11
Mg^{2+}	123.23	71.60
Zn^{2+}	0	0

(8) APE 2325 反应活化能

恩格斯曾明确地指出“ 生命的起源必然是通过化学的途径实现的 ”。也就是通过化学的进化来实现的,即从一种物质转化成另一种物质,由简单物质转化为复杂物质,由无生命的物质转化成有生命的物质,由生命的物质转化成无生命的物质——生命的结束。在所有这些过程中没有一个不通过化学反应的过程。一涉及化学反应过程就存在反应快慢的问题,而反应的快慢又取决于这个过程反应活化能,活化能高,反应慢;活化能低,则反应快。

在图 4-5 中的曲线上选取 $40-80^{\circ}C$ 的 5 个点,用 Arrhenius 做图法计算出活化能约为 $17.557kJ\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1}$ (图 4-10)。和来自脐橙的酯

酶（其活化能为 $56.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ）相比，APE 2325 反应活化能低得多⁽⁶⁴⁾。

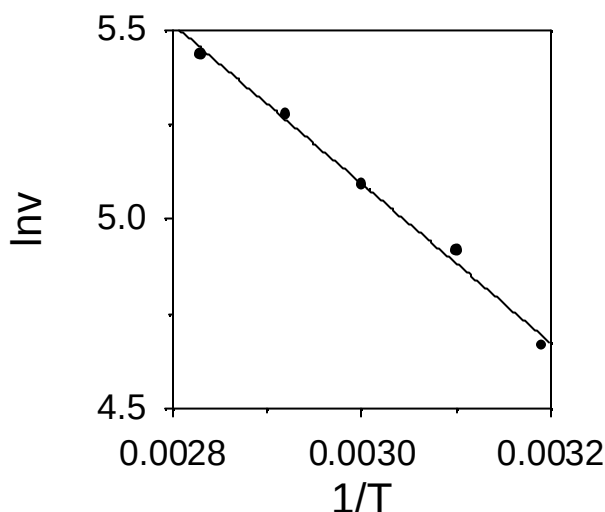


Fig 4-10 Arrhenius plot of APE 2325.

(9) APE 2325 的光谱学性质

温度变化可以导致酶活力的变化，所以我们考察不同温度对酶构象的影响，即通过荧光强度的变化来考察酶的构象的变化。

荧光的发生是通过一个化合物吸收光子而产生激发态，后又因光子的重新发射而衰退。衰退可能通过与一个分子相碰撞，或通过分子内能量转移到另一个基因上去而发生，这时荧光称为淬灭。结合在配基上的一个蛋白质的色氨酸的荧光淬灭，通常可作为测定结合程度低的一个有用手段。在水中，色氨酸的银光强度非常弱，但在蛋白质非极性区域内，它的荧光则可能被增强了。所以荧光对于分子的构象是敏感的，可以用来探测蛋白质（及其聚合物）外形的变化。

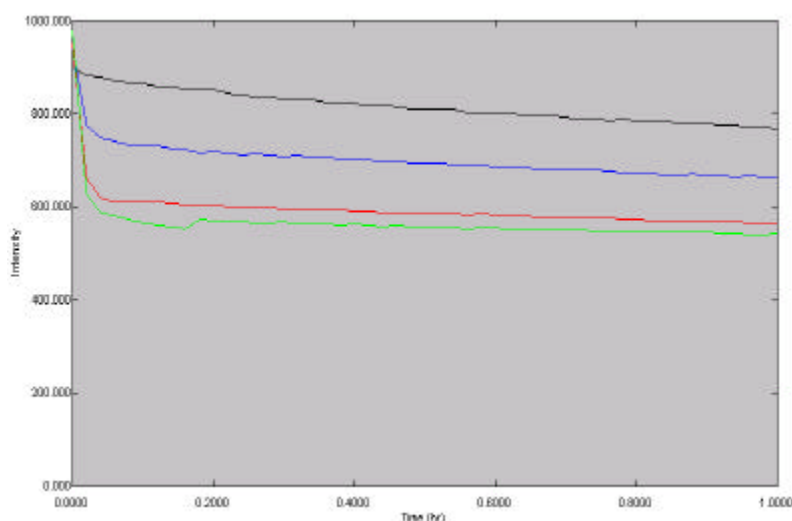


Fig 4-11 Fluorescence time course spectra of APE 2325 at different temperature. Black curve: APE 2325 was incubated at 50°C for 10min; Blue curve: APE 2325 was incubated at 60°C for 10min; Red curve: APE 2325 was incubated at 80 °C; Green curve: APE 2325 was incubated at 90°C.

由图 4-5 可见，随着环境温度的升高，APE 2325 活力增加，推测温度对酶构象是有影响的，高温可以促进酶活性构象的形成。图 4-11、图 4-12 表明酶在不同温度下发挥作用时的构象不同，在最适温度 90°C 时内部疏水性生色氨基酸暴露于溶液中，使生色团残基和折叠的蛋白质链的其余部分之间发生相互作用静态猝灭以及生色团残基和环境溶液发生碰撞猝灭增加，从而使荧光强度减弱，因此有可能激活了酶在低温时原始的无活性构象。

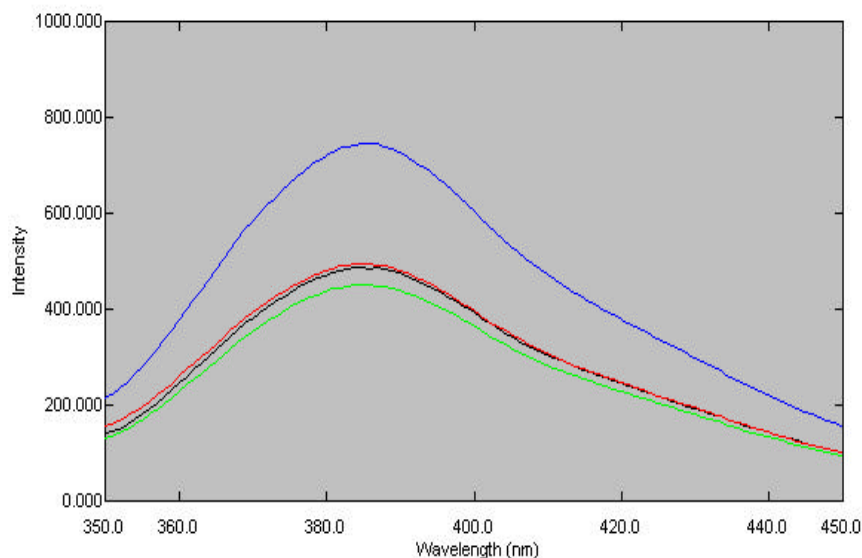


Fig 4-12 Fluorescence emission spectra of APE 2325 at different temperature. Blue curve: APE 2325 was incubated at 50°C for 10min; Red curve: APE 2325 was incubated at 80°C for 10min; Green curve: APE 2325 was incubated at 90°C; Black curve: APE 2325 was incubated at 100°C.

四. 小结

酶的基本酶学性质是研究酶结构与功能的基础,是开发酶应用于特殊领域的必要依据。嗜热磷脂酶 A₂ 的酶学性质主要包括酶的最适作用温度、最适 pH、酶的热稳定性及底物特异性等。对嗜热酶而言,其热稳定性是标志其功能的一个重要指标,是研究嗜热磷脂酶 A₂ 适应机制的前提和基础。

本章对 APE 2325 的基本酶学性质进行研究,观察在高温条件下酶的热稳定性,为进一步分析酶的结构与功能关系奠定基础。对纯化的重组酶 APE 2325 进行酶学性质研究结果表明:该酶既具有磷脂酶 A₂ 活力又具有酯酶活力。发挥催化活力的最适温度为 90°C,最适 pH 为 8.0。该酶具有较强的耐碱性和较高的热稳定性。酶在

碱性环境中稳定性较高，保存 24 小时之后残余活力为 80%以上，但在 pH4.0 的酸性环境中保存 24 小时酶活力几乎完全丧失。在 70℃保温 60 分钟酶活力没有损失，在 80℃保温 60 分钟酶的残余活力为 76.64%，在 90℃保温 60 分钟酶的残余活力为 68.23%，在 100℃保温 60 分钟酶的残余活力为 46.69%。动力学研究表明，90℃时的 K_m , k_{cat} , V_m 分别为 $103.3 \mu M$, $39.04 s^{-1}$, $249.69 u/mg$ 。

随着环境温度的升高，APE 2325 活力增加；该酶的荧光光谱研究表明：酶的构象随温度升高也发生了相应的变化，推测高温使内部疏水性生色氨基酸暴露于溶液中，激活了酶在低温时原始的无活性构象，促进酶活性构象的形成。这些基本酶学性质的确定都有利于我们进一步预测和研究嗜热酶的结构，及普遍的适应性机制。

第五章 APE 2325 的序列和结构预测

一. 实验数据来源与分析软件

1. 待分析的多种磷脂酶 A₂ 氨基酸序列

NCBI GENE BANK 提供

2. 已知的嗜热磷脂酶 A₂ 结构

NCBI STRUCTURE 提供

3. 同源序列分析和二级结构预测软件

DNASIS

4. 数据下载与软件分析的操作平台

AMD—KT (TM) PROCESSOR

MICROSOFT WINDOWS 2000

二. 结果与讨论

1. 氨基酸同源性分析结果

在生物科学研究中，有一个常用的方法，就是通过比较分析获取有用的信息和知识。达尔文正是研究比较了 Galapagos finches 同其他一些物种的形态学特征，从而提出了自然选择学说。今天，我们对基因和蛋白质序列进行比较，从本质上来讲是同达尔文一样，进行同样的分析，只不过更加精细，更加详尽。在这个意义上，我们从核酸和氨基酸的层次去分析序列的相同点和不同点，以其能够推测它们的结构、功能以及进化上的联系。

进行序列比较的目的就是让人们能够判断序列之间是否具有足够的相似性，从而判定二者之间是否具有同源性。虽然相似性和同源性在某种程度上具有一致性，但它们是完全不同的两个概念。相似性是指一种很直接的数量关系，比如部分相同或相似的百分比或其它一些合适的度量，而同源性是指从一些数据中推测出的两个基因在进化上曾具有共同祖先的结论，它是质的判断。

进行相似性序列分析的蛋白质分别为：

SVI PLA₂ 来源于原核菌 *Streptomyces violaceoruber*, 122 个氨基酸

APE 2325 来源于古细菌 *Aeropyrum pernix K₁*, 157 个氨基酸

AME PLA₂ 来源于蜜蜂的 *Apis mellifera*, 134 个氨基酸

BCA PLA₂ 来源于金环蛇的 *Bungarus caeruleus*, 118 个氨基酸

BTA PLA₂ 来源于牛的 *Bos taurus*, 123 个氨基酸

PFL PLA₂ 来源于细菌 *Pseudomonas fluorescens bv.*, 128 个氨基酸

SSC PLA₂ 来源于猪的 *Sus scrofa*, 124 个氨基酸

VAM PLA₂ 来源于毒蛇的 *Vipera ammodytes*, 157 个氨基酸

这些 PLA₂ 根据来源可分为三类，一类是真核生物：包括 AME PLA₂、BCA PLA₂、BTA PLA₂、SSC PLA₂、VAM PLA₂，而且都是 sPLA₂。一类是真细菌，包括 SVI PLA₂、PFL PLA₂。一类是古细菌，包括 APE 2325。

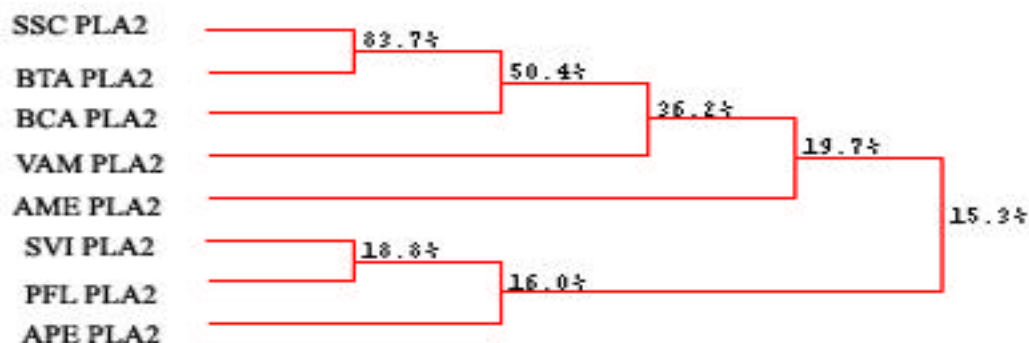
Table 5-1 Comparison of amino acid sequence of different PLA₂

	AME	BCA	BTA	PFL	SSC	SVI	VAM
	PLA ₂	PLA ₂	PLA ₂	PLA ₂	PLA ₂	PLA ₂	PLA ₂
APE							
2325	17.9%	15.2%	15.4%	15.6%	13.7%	16.3%	17.2%

由图 5-1 可知，BCA PLA₂、BTA PLA₂、SSC PLA₂ 具有很高的相似性，高达 83.7%，而且具有保守的 14 个半胱氨酸。而通过氨基酸序列比较可以看出，古细菌 PLA₂ 同其他的 PLA₂ 相似性很低，如表 5-1。

APE PLA2	M	G	V	N	E	A	Y	E	A	L	L	R	A	C	G	D	G	D	F	E	E	C	R	S	G	Y	Q	R	F	L	30			
AME PLA2	I	I	Y	P	-	-	-	G	T	L	W	C	G	H	G	N	K	S	S	G	P	N	E	L	G	R	F	K	H	T	27			
BCA PLA2	N	-	-	-	-	-	-	L	I	Q	F	K	N	M	I	-	Q	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12			
BTA PLA2	A	-	-	-	-	-	-	L	W	Q	F	N	G	M	I	-	K	C	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12			
VAM PLA2	N	-	-	-	-	-	-	L	F	Q	F	G	D	M	I	L	Q	K	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13			
SSC PLA2	A	-	-	-	-	-	-	L	W	Q	F	R	S	M	I	-	K	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12			
SVI PLA2	A	-	-	-	-	-	-	P	A	D	K	P	Q	V	L	A	S	F	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13			
PFL PLA2	A	E	C	K	-	-	-	V	T	V	D	S	T	D	Q	M	S	F	N	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17			
APE PLA2	E	E	A	C	R	E	A	G	T	C	P	K	R	-	-	R	S	S	G	A	G	R	G	K	Y	V	W	V	E	S	58			
AME PLA2	D	A	C	C	R	T	H	D	M	C	P	D	V	-	-	M	S	A	G	E	S	K	H	G	L	T	N	T	A	S	55			
BCA PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	T	R	P	W	T	A	Y	V	N	Y	G	C	Y	-	26			
BTA PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	P	S	S	E	P	L	D	F	N	N	Y	G	C	Y	-	28		
VAM PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	K	E	A	V	H	S	Y	A	I	Y	G	C	Y	-	27		
SSC PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	P	G	S	H	P	L	M	D	F	N	N	Y	G	C	Y	-	28
SVI PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	T	S	A	S	S	Q	N	A	W	L	A	A	N	-	27		
PFL PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	A	I	E	I	D	K	S	C	K	T	F	T	V	-	31		
APE PLA2	I	I	R	S	G	V	P	D	G	R	S	R	L	I	L	Y	V	I	S	R	Y	L	V	N	V	K	G	L	E	P	88			
AME PLA2	H	T	R	L	S	C	D	C	D	D	K	-	-	-	-	F	Y	D	C	L	K	N	S	A	D	T	I	S	S	80				
BCA PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	G	K	G	G	S	G	T	P	V	D	-	37			
BTA PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	G	L	G	G	S	G	T	P	V	D	-	39			
VAM PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	G	W	G	G	Q	G	R	A	Q	D	-	38			
SSC PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	G	L	G	G	S	G	T	P	V	D	-	39			
SVI PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	N	Q	S	A	W	A	A	Y	E	F	-	38			
PFL PLA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	L	T	H	S	G	S	L	P	K	N	-	42			

APE PLA2	G E A E A V I D E F L R V C C E - - - K H G - - - - N C R	110
AME PLA2	Y F V G K M Y F N L I D T K C Y - - - K L E - - - - H P V	102
BCA PLA2	E L D R C C Y T H D N C Y N E A E K I P G C - - - - N F N	62
BTA PLA2	D L D R C C Q T H D N C Y K Q A K K L D S C K V L V D N P Y	69
VAM PLA2	A T D R C C F A Q D C C Y G R V - - - N D C - - - - N H K	60
SSC PLA2	E L D R C C E T H D N C Y R D A K N L D S C K F L V D N P Y	69
SVI PLA2	D W S T D L C T Q A P D N P F G - - - F P F - - - - N T A	60
PFL PLA2	V H G H N W V L S S A A D M P G - - - I A S - - - - D G H	64
APE PLA2	K - - I Y K S W I R N V L R R V R - E G G U R P M T L E R -	136
AME PLA2	T - - - - - - - - G C G E R T - E G R C L H Y T V D K -	120
BCA PLA2	I K T V S Y T C T E P N L T C T D T A D T C A R F L C N C D	92
BTA PLA2	T N N Y S Y S C S N N E I T C S S E N N A C E A F I C N C D	99
VAM PLA2	T A T Y T Y S F E N G D I V C G D - N D L C L R A V C E C D	89
SSC PLA2	T E S V S Y S C S N T E I T C N S K N N A C E A F I C N C D	99
SVI PLA2	C A R H D F G Y R N Y K A A G S F - D A N K S R I D S A F Y	89
PFL PLA2	A A G I D K N Y L K E G D T R V I - A H T K I I G A G E K D	93
APE PLA2	- - - - - - - - - I R S E D P E L Y R - - I I E P I V	152
AME PLA2	- - - - - - - - - S K P K Y Y Q W F D - - L R K Y	134
BCA PLA2	R T A A I C F A S A P - - - - - V N S - - N N V M I S	112
BTA PLA2	R N A A I C F S K V P - - - - - Y N K - - E H K N L D	119
VAM PLA2	R A A A I C L G E N V N T Y D K N Y E Y Y S - - I S H C T E	117
SSC PLA2	R N A A I C F S K A P - - - - - Y N K - - E H K N L D	119
SVI PLA2	E D H K R V C T G Y T G E K N T A C N S T A - - W T Y Y Q A	117
PFL PLA2	S V T F D V S K L A A G T D Y A F F C S F P G H I S M M K G	123
APE PLA2	S A G G G	157
ASE PLA2		134
BCA PLA2	S S T N C Q	118
BTA PLA2	- K K N C	123
VAM PLA2	E S E O C	122
SSC PLA2	T K K Y C	124
SVI PLA2	V K I F G	122
PFL PLA2	T V T V K	128

Fig 5-1 Sequence alignment of PLA₂ from different sources.Fig 5-2 Evolution tree of PLA₂ from different sources.

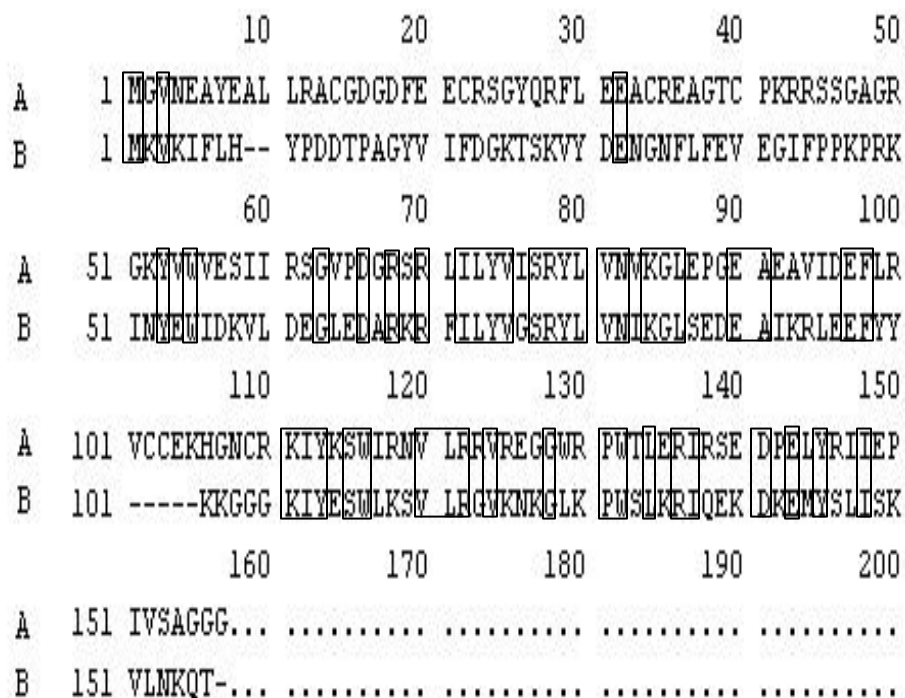


Fig 5-3 Sequence alignment of APE 2325 and archaea. A:APE 2325; B: 149aa long hypothetical protein from an archaea *Sulfolobus tokodaii*.

PLA₂根据分子量、氨基酸序列和同源性、钙离子的依赖性和细胞位置可分为不同种类，其中 sPLA₂主要来自眼镜蛇、金环蛇、响尾蛇和毒蛇，其分子量大约为 14kDa,包括数个半胱氨酸,形成 5-7 个二硫键，产生刚硬的三维结构，结构比较保守，His-Asp 是其催化中心，钙离子紧紧结合于活性中心，因此经常用于研究结构、功能和调控。该类酶对 Sn-2 酯键的断裂无专一性。而 cPLA₂分子量大约为 85kDa,与 sPLA₂无序列同源性，对 Sn-2 酯键的断裂有专一性，包括 N 端钙离子结合区和调控区（4 个丝氨酸），催化中心为 G-X-S-X-G。iPLA₂其分子量大约为 29-85 kDa，对钙离子无依赖性，其催化中心为 Ser。

和 NCBI—GENE BANK 上提供的所有序列相比较，和 APE

2325 具有最大序列相似性的是来自于古细菌 *Sulfolobus tokodaii* 的一种未知蛋白，结果如图 5-3 所示。

从以上的序列分析以及前面的性质研究可以表明，这是一种新型的 PLA₂，分子量大约为 17 kDa，无钙离子依赖性，只有 7 个半胱氨酸，序列同源性低，因此可以推测 APE 2325 属于 iPLA₂。

2. APE 2325 的结构预测

与已知的核酸序列一样，所有蛋白质序列，无论是直接测得还是由核酸序列中的开放阅读框转换而来，都包含有决定其结构或功能的内在信息。可惜用实验方法获取这些信息的速度远远赶不上原始序列数据产生的速度。像圆二色谱、旋光色散、X 光晶体衍射和核磁共振都是取定结构特征的强有力的技术，但它们的实现需要大量的时间，并对技术和技巧都有很高的要求。对比蛋白质序列和结构数据库的容量可知两类信息之间差距已十分明显，为缩小这一差距所做的尝试都围绕于预测方法。这些序列条目能在缺少生物化学数据的情况下提供关于蛋白质性质的见解。

Amino Acid		Count	Mol%
Ala	A	9	5.73
Arg	R	11	13.37
Asn	N	4	2.54
Asp	D	5	3.18
Cys	C	7	4.45
Gln	Q	1	0.63
Glu	E	18	11.46
Gly	G	18	11.46
His	H	1	0.63
Ile	I	11	7.00
Leu	L	11	7.00
Lys	K	6	3.82
Met	M	1	0.63
Phe	F	3	1.91
Pro	P	6	3.32
Ser	S	10	6.36
Thr	T	8	1.27
Trp	W	4	2.54
Tyr	Y	7	4.45
Val	V	12	7.64

Fig 5-4 Amino acid constitute of APE 2325.

核酸序列所包含的 4 种碱基的化学性质相当相似，与之不同的是，构成蛋白质的 20 种氨基酸主要由于化学构造上的差别，因而在结构和功能上存在更大的多样性。任一残基对蛋白质的整体物理性质都会产生影响，因为这些氨基酸本身就是酸性或者碱性的，亲水的或疏水的，有直链、侧链或芳香环，因而每种残基对构成蛋白质域中不同类型的结构都存在偏向。当然，这些属性就是生物化学的核心原理之一：序列决定构象的基础。正确应用这些预测技术，并参照主要的生化实验数据，就能提供有关蛋白质与功能的有价值信息。

目前科学家已从嗜热菌中分离出各种蛋白质，其中包括许多重要的酶类，它们的热稳定性高于嗜温菌的类似酶。嗜热菌酶的耐热性主要取决于两个方面：（1）稳定的天然结构；（2）细胞内存在促热稳定因素。研究表明，酶本身的一级结构对其耐热性具有重要作用。酶的一级结构中某些关键区域的个别氨基酸改变，就会引起高级结构的变化，使酶蛋白结构中的氢键、离子键或疏水键稍有增加，从而提高整个分子的热稳定性。

Table 5-2 Hydropholic residue comparison of PLA₂ from different sources.

Amino Acid	APE PLA ₂	AME PLA ₂	BCA PLA ₂	BTA PLA ₂	VAM PLA ₂	SSC PLA ₂	SVI PLA ₂	PFL PLA ₂
A	5.73	2.98	7.62	4.87	8.19	6.45	16.39	9.3
F	1.91	3.73	2.54	3.25	3.27	4.03	7.37	4.6
G	11.46	8.2	5.93	4.87	9.01	4.83	4.91	8.5
I	7	2.98	5.08	4.06	4.09	4.03	1.63	6.2
L	7	6.71	3.38	6.50	4.09	5.64	2.45	3.
M	0.63	2.23	1.69	0.81	0.81	1.61	0.81	4.6
P	3.82	3.73	5.08	4.60	0.81	4.03	4.09	2.3
V	7.64	3.73	2.54	3.25	4.09	1.61	2.45	7.8
W	2.54	1.49	0.84	0.81	0.81	0.8	3.27	0.7
Total								

(%)	47.73	35.78	34.7	33.02	34.36	33.03	43.37	48.4
-----	-------	-------	------	-------	-------	-------	-------	------

通过许多比较可知，脯氨酸的结构熵比其它氨基酸小，更易折叠。一旦折叠，则需要更高的能量才能解开。所以在不会引起蛋白质三维结构相反变化的位点，脯氨酸的代替可以提高热稳定性。蛋白质高级结构的形成主要依靠非共价键，即氢键、离子键和疏水键。从图 5-4 可知，APE 2325 含有 Arg (13.37%) 和 Glu (11.46%)，形成离子键的几率很大，这样有助于提高稳定性。从表 5-2 可以看出，和其它 PLA₂ 相比，APE 2325 疏水残基所占比例和真细菌相似，比真核生物常温酶 PLA₂ 要大得多，可见疏水键有利于稳定性的提高。

二级结构预测表明（如图 5-5），APE 2325 形成了以 β 折叠片为中心，两边有多个长度不等的 α 螺旋环绕的 α/β 拓扑结构。结构中的盐桥将相应的 α 螺旋— α 螺旋， β 折叠— β 折叠， α 螺旋和 β 折叠进一步连接起来，对形成蛋白质分子内部核心和支持酶分子在整体拓扑结构起了重要作用。一些以及结构序列上相距较远的残基间的氢键，对分子的整体构象作出了一定的贡献。至于该结构的正确性程度究竟如何，还有待于晶体结构的测定和其它生化实验检验。

MGVNEAYEALLRACGDGDFEECRSGYQRFLEEACREAGTCPKRRSSGAGR
 HELIX HHHHHHHHHHHhh hhhHHHHHHHHhh
 SHEET sssssss sSSs
 TURN TTTTTTTT TTTTTT TTTTTTTTTTTT
 COIL CC

60 70 80 90 100
 GKYVWVESIIRSGVPDGRSRLILYVISRYLVNVKGLEPGAEAVIDEFLR
 HELIX hhhhhhhhh hhhhhh hhhHHHHhhhhhh
 SHEET SSSSSSSs SSSSSsSSSSSs SSSSSS
 TURN TT TTTTTTTTTT TTTT TTTT
 COIL C

110 120 130 140 150
 VCCEKHGNCRKIYKSWIRNVLRRVREGGWRPWTLEIRSEDPELYRIIEP
 HELIX hhHh
 SHEET SSs sSssssSSSSSSS sssssSSSS sSSSSSS
 TURN TTTTTTTT TTTT TTTTTTTT TTTTTT
 COIL C

157
 IVSAGGG
 HELIX
 SHEET SS
 TURN TTTTT
 COIL

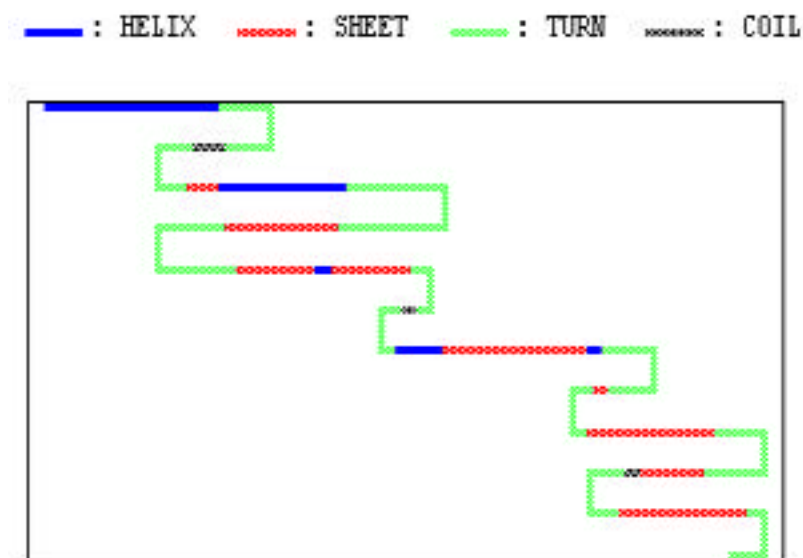


Fig 5-5 Second structure prediction of APE 2325.

三. 小结

70年代以来，DNA 测序方法的飞速发展，极大地引发了序列信息量的扩增，从而使可供比较的序列数量呈现爆炸式增长。分子生物学家已经意识到，将未知序列同整个数据库中的已知序列进行比较分析将成为一个强有力的研究手段。酶不同的性质与功能，反应了酶之间结构的差异。同源序列分析，即对同功能蛋白质一级结构的比较，一直以来都是分析蛋白质结构与功能关系最基本的方法。

本章以 APE 2325 同源序列分析和结构解析为基础，集中分析该重组酶由于与其它磷脂酶 A₂ 氨基酸的差异，而导致的热稳定差异，为嗜热酶作用机制的研究提供又一有益的模式。

通过同源序列分析，发现来自于 *Aeropyrum pernix* K₁ 的嗜热酶 APE 2325 与其他磷脂酶 A₂ 相似性较低，结合性质实验从而确定了 APE 2325 属于钙离子不依赖性磷脂酶 A₂。利用二级结构预测软件，对其氨基酸组成进行分析，并和其他嗜热酶比较，从而分析了

导致嗜热酶热稳定性的原因。

总 结

本文以研究来自嗜热古细菌 *Aeropyrum pernix* K₁、GENE BANK 上预测具有磷脂酶 A₂ 结构域的 APE 2325 为出发点,纯化了工程菌表达的酶 APE 2325。根据同源序列分析,确定了此酶在进化中的位置;通过高级结构预测,明确了此酶在研究嗜热酶适应机制方面的重要作用;同时深入探讨了该酶的基本酶学性质、动力学性质以及该酶内源荧光和活力变化关系。

我们根据 GENE BANK 上提供的 APE 2325 基因设计 5' 端和 3' 端引物,然后用软件验证并合成。从超嗜热需氧古生菌 *Aeropyrum pernix* K₁ 中抽提出染色体基因组,经 PCR 扩增得到 APE 2325 基因,用带有 His-tag 标记的 pET15b 作为表达载体,在大肠杆菌 BLP 中成功地诱导表达。表达产物经过 Ni-螯合柱一步得到纯化,SDS-PAGE 电泳检测只有一条带,其准确分子量为 17871Da。于是获得了既具有磷脂酶 A₂ 活力又具有酯酶活力的工程菌 APE 2325。

以本室构建的产嗜热酶 APE 2325 工程菌为产酶菌株,大批发酵产酶,通过热变性与亲和层析的方法获得了电泳纯的嗜热酶 APE 2325。进行其基本酶学性质研究表明:该酶发挥催化活力最适温度为 90℃,最适 pH 为 8.0。该酶具有较强的嗜碱性和较高的热稳定性。在碱性环境中稳定性较高,保存 24 小时之后残余活力还剩 80% 以上,但在 pH4.0 的酸性环境中保存 24 小时酶活力几乎丧失。在 70℃保温 60 分钟酶活力没有损失,在 80℃保温 60 分钟酶活力还

剩 76.64%，在 90℃保温 60 分钟酶活力还剩 68.23%，在 100℃保温 60 分钟酶活力还剩 46.69%。动力学研究表明， K_m , k_{cat} , V_m 分别为 103.3 μ M, 39.04s⁻¹, 249.69u/mg。

APE 2325 的荧光光谱研究表明：随着环境温度的升高，APE 2325 活力增加，同时酶的构象也发生了相应的变化，推测高温使内部疏水性生色氨基酸暴露于溶液中，激活了酶在低温时原始的无活性构象，促进酶活性构象的形成。

通过同源序列分析表明 APE 2325 酶与其他磷脂酶 A₂ 同源性较低，对钙离子没有依赖性，所以推测 APE 2325 属于 iPLA₂。利用二级结构预测软件，对其氨基酸组成进行分析，并和其他嗜热酶比较，从而分析了导致嗜热酶热稳定性的原因。该嗜热 APE 2325 酶的纯化为进一步研究其结构与功能提供了又一有利的工具和宝贵的资源。

总 结

本文以研究来自嗜热古细菌 *Aeropyrum pernix* K₁、GENE BANK 上预测具有磷脂酶 A₂ 结构域的 APE 2325 为出发点，纯化了工程菌表达的酶 APE 2325。根据同源序列分析，确定了此酶在进化中的位置；通过高级结构预测，明确了此酶在研究嗜热酶适应机制方面的重要作用；同时深入探讨了该酶的基本酶学性质、动力学性质以及该酶内源荧光和活力变化关系。

我们根据 GENE BANK 上提供的 APE 2325 基因设计 5' 端和 3' 端引物，然后用软件验证并合成。从超嗜热需氧古生菌

Aeropyrum pernix K₁ 中抽提出染色体基因组，经 PCR 扩增得到 APE 2325 基因，用带有 His-tag 标记的 pET15b 作为表达载体，在大肠杆菌 BLP 中成功地诱导表达。表达产物经过 Ni-螯合柱一步得到纯化，SDS-PAGE 电泳检测只有一条带，其准确分子量为 17871Da。于是获得了既具有磷脂酶 A₂ 活力又具有酯酶活力的工程菌 APE 2325。

以本室构建的产嗜热酶 APE 2325 工程菌为产酶菌株，大批发酵产酶，通过热变性与亲和层析的方法获得了电泳纯的嗜热酶 APE 2325。进行其基本酶学性质研究表明：该酶发挥催化活力最适温度为 90℃，最适 pH 为 8.0。该酶具有较强的嗜碱性和较高的热稳定性。在碱性环境中稳定性较高，保存 24 小时之后残余活力还剩 80% 以上，但在 pH4.0 的酸性环境中保存 24 小时酶活力几乎丧失。在 70℃保温 60 分钟酶活力没有损失，在 80℃保温 60 分钟酶活力还剩 76.64%，在 90℃保温 60 分钟酶活力还剩 68.23%，在 100℃保温 60 分钟酶活力还剩 46.69%。动力学研究表明，K_m, k_{cat}, V_m 分别为 103.3μ M, 39.04s⁻¹, 249.69u/mg。

APE 2325 的荧光光谱研究表明：随着环境温度的升高，APE 2325 活力增加，同时酶的构象也发生了相应的变化，推测高温使内部疏水性生色氨基酸暴露于溶液中，激活了酶在低温时原始的无活性构象，促进酶活性构象的形成。

通过同源序列分析表明 APE 2325 酶与其他磷脂酶 A₂ 同源性较低，对钙离子没有依赖性，所以推测 APE 2325 属于 iPLA₂。利用二级结构预测软件，对其氨基酸组成进行分析，并和其他嗜热酶比较，从而分析了导致嗜热酶热稳定性的原因。该嗜热 APE 2325 酶的纯化为进一步研究其结构与功能提供了又一有利的工具和宝贵的资源。

摘 要

Aeropyrum pernix K₁，是 1993 年从日本海岸火山口分离的一种超嗜热古细菌，可以在 95℃最适生长，并能产生多种嗜热酶。近年来，随着嗜热酶相继得到开发，使其在许多领域发挥了重要作用。嗜热酶不仅具有化学催化剂无法比拟的优点，而且稳定性极好，可以克服中温酶及低温酶在应用中常常出现的生物学性质不稳定的现象，从而使很多高温化学反应过程得以实现，这将极大地促进生物技术产业的发展，从而带动技术水平和生活质量的提高。目前，嗜热酶的研究还处于初期阶段，这就使既具有磷脂酶 A₂ 活力又具有酯酶活力的嗜热 APE 2325 酶的研究变得很重要。

磷脂酶 A₂ 具有很多生物学功能，参与许多生理活动。近年来发现它具有广泛的心血管药理效应，从而引起人们新的研究兴趣。正是磷脂酶 A₂ 这种相对简单的化学结构和复杂的药理生理功能之间的反差，使之成为研究脂质代谢、脂蛋白代谢、生物膜磷脂结构以及脂-蛋白相互作用的结构和功能的重要工具酶。生物技术？

本文进行了 *Aeropyrum pernix* K₁ APE 2325 基因的克隆、在大肠杆菌中的表达以及部分酶学性质研究，从而对其理化性质有了初步的研究。

我们从超嗜热需氧古生菌 *Aeropyrum pernix* K₁ 中抽提出染色体基因组，经 PCR 扩增得到磷脂酶 A₂ 基因，用带有 His-tag 标记的 pET15b 作为表达载体，在大肠杆菌 BLP 中成功地诱导表达。表达产物经过 Ni-螯合柱一步得到纯化，SDS-PAGE 电泳检测只有一条带，其准确分子量为 17871Da。于是获得了能产生磷脂酶 A₂ 的工程

菌 APE PLA₂。

为了磷脂酶 A₂ 的应用，我们研究了 APE PLA₂ 的基本酶学性质。在基本性质研究中，主要考察了温度、pH、底物特异性及金属离子、动力学等影响因素。对纯化后的磷脂酶 A₂ 进行薄层层析测定和紫外检测，测定其同时具有磷脂酶 A₂ 和酯酶活性。APE PLA₂ 最适反应温度为 90℃，最适 pH 范围为 8.0。该酶具有较强的嗜碱性和较高的热稳定性。在碱性环境中稳定性较高，保存 24 小时之后残余活力还剩 80% 以上，但在 pH4.0 的酸性环境中保存 24 小时酶活力几乎丧失。在 70℃ 保温 60 分钟酶活力没有损失，在 80℃ 保温 60 分钟酶活力还剩 76.64%，在 90℃ 保温 60 分钟酶活力还剩 68.23%，在 100℃ 保温 60 分钟酶活力还剩 46.69%。动力学研究表明， K_m , k_{cat} , V_m 分别为 103.3 μ M, 39.04 s⁻¹, 249.69 u/mg。APE 2325 的荧光光谱研究表明：随着环境温度的升高，APE 2325 活力增加，同时酶的构象也发生了相应的变化，推测高温使内部疏水性生色氨基酸暴露于溶液中，激活了酶在低温时原始的无活性构象，促进酶活性构象的形成。

通过同源序列分析表明 APE 2325 酶与其他磷脂酶 A₂ 同源性较低，对钙离子没有依赖性，所以推测 APE 2325 属于 iPLA₂。利用二级结构预测软件，对其氨基酸组成进行分析，并和其他嗜热酶比较，从而分析了导致嗜热酶热稳定性的原因。

至此我们成功地在 大肠杆菌 中表达 *Aeropyrum pernix* K₁ 磷脂酶 A₂ 基因，这将为以后对磷脂酶 A₂ 的结构和功能研究打下很好的基础。

Abstract

Phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4, PLA₂) enzymes are frequently found in nature, especially in mammalian pancreas and animal venoms. They catalyze the hydrolysis of phospholipids at the *sn*-2 position of the glycerol backbone to release fatty acid and the corresponding 1-acyl lysophospholipid. PLA₂ have been classified into three main groups: 14-kDa secreted enzyme (sPLA₂), the 85-kDa cytosolic enzyme (cPLA₂), and a calcium-independent enzyme (CaI-PLA₂) found in myocardial tissue. The release of arachidonic acid (AA) from membranes by PLA₂ and its subsequent conversion into leukotrienes, prostaglandins, and other eicosanoids plays an important role in inflammation.

The hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K₁ grow optimally at more than 90°C and produce many interesting thermophilic enzyme. These enzymes are characterized by a high degree of thermophilicity and thermostability. The study of enzymes extracted from thermophilic sources is helpful in elucidating the mechanisms of thermal stability; knowledge of the molecular strategies used to realize thermostable proteins is of great importance not only for its biochemical interest but for biotechnological applications as well.

Recently, the sequence of the genome of *Aeropyrum pernix* K₁ was completed at the National Institute of Technology and

Evaluation (Tokyo, Japan). The open reading frame was found, composed of 474 bases. The PCR amplified gene was hydrolyzed using Nde⁺ and BamH⁺, inserted in pET15b cut with the same restriction enzymes and expressed in the host *E.coli* BLP. The recombined phospholipase A was purified by Ni-chelation chromatography with only a one-step procedure. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of this enzyme was 17871 Da. It showed an optimal activity at 90°C and a pH of 8.0 (at 90°C). Kinetic analysis revealed K_m , k_{cat} , V_m were estimated at 103.3 μM , 39.04 s⁻¹, 249.69 u/mg respectively. And APE PLA₂ was thermally stable. It remained 46.69% of the original activity after incubation at 100°C for 1 hour.

Now, PLA₂ from *Aeropyrum pernix* K (APE PLA₂) has been successfully expressed in our lab. At the same time esterase activity was also observed in this enzyme. It is interesting to basic science as well as technological application for use. Moreover, this is the first successful expression of recombinant PLA₂ from archaeon, which is not reported in the world until now. This study will facilitate the further study of structure-function relationship of PLA₂ and the potential medicine development.

致 谢

我的论文是在曹淑桂教授和冯雁教授的悉心指导下完成的。尤其是冯雁老师和曹淑桂老师在我进入实验室以来亲临指导,她们的严谨的工作态度和刻苦敬业的精神使我受益非浅。在此向两位老师致以最诚挚的谢意!

在论文的完成过程中,曾得到韩四平、高贵、王智和高仁钧老师的热情帮助,另外解桂秋、郑良玉、杨珍、王柏婧、翁良、纪昕、赵丹彤、李娜、邓春光等同学也对我的实验工作给予了很大的帮助,在此一并感谢。