

没食子酸脱羧酶的分离与纯化

李文君, 王成章*

中国林业科学研究院林产化学工业研究所 生物质化学利用国家工程实验室 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 南京 210042

摘要: 本实验研究了没食子酸脱羧酶(Gallic acid decarboxylase, GAD)的提取、分离、分析及结构表征。建立了考马斯亮蓝法($Y = 4.8748X - 0.0225$, $R^2 = 0.9922$)和双缩脲法($Y = 0.2476X + 0.0003$, $R^2 = 0.9993$)测定 GAD 蛋白含量的线性方程。对 GAD 粗酶液, 先采用 pH 为 6, 60%/70% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐沉淀 32 h; 然后, 利用 35 kD 透析膜处理料液 12 ~ 16 h; 再将透析液经二乙氨基乙基(Diethyl Aminoethanol, DEAE)纤维素树脂, 在 pH 为 6.5 时饱和和吸附量可达 2.838 mg/g, 采用 0.4 mol/L NaCl 溶液进行洗脱的洗脱液经过 G-100 葡聚糖凝胶纯化。采用 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺电泳分离得到蛋白样品条带, MALDI-TOF-MS 进行结构表征, 得到的蛋白分子质量 45.62 kD, 等电点 5.19, 与已知蛋白质 gi/334732950 匹配度为 53, 说明两者具有相似性, 但匹配到的序列组仅占蛋白全序列的 3%, 初步推测 GAD 可能是一种新的酶。

关键词: 没食子酸脱羧酶; 微生物降解; 焦性没食子酸; 结构表征

中图分类号: Q814.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.7.021

Separation and Purification of Gallic Acid Decarboxylase

LI Wen-jun, WANG Cheng-zhang*

Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical

Utilization; Key and Open Lab. of Forest Chemical Engineering, SFA; Key Lab. of Biomass Energy and Material, Nanjing 210042, China

Abstract: This paper mainly studied the extraction, separation, analysis and structural characterization of gallic acid decarboxylase (GAD). The linear regression equation was established to determine GAD content by Coomassie brilliant blue method ($Y = 4.8748X - 0.0225$, $R^2 = 0.9922$) and biuret colorimetry method ($Y = 0.2476X + 0.0003$, $R^2 = 0.9993$). 60% and 70% Ammonium sulfate was used to purify crude enzyme solution twice for 32 h with pH 6; then, 35 kD dialysis membrane was used to filter the solution for 12-16 h; DEAE cellulose resin was applied to sequentially purify the solution and found the saturated adsorption amount of resin was 2.838 mg/g with the buffer of pH 6.5; G-100 Sephadex gel was selected to further purify enzyme extract in the present of 0.4 mol/L NaCl as the eluent. SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis was used to separate the protein and MALDI-TOF-MS was applied to analyze and identify its structure; the molecular weight was 45.62 kD, isoelectric point 5.19, matching to protein gi/334732950, it showed they had similar properties, but because matching rate was only 3%, hence it was supposed that GAD could be a new protein.

Key words: gallic acid decarboxylase; microbial degradation; pyrogallic acid; structural characterization

焦性没食子酸是一种具有普遍应用的化工试剂, 传统上主要由没食子酸经过化学法脱羧制得, 但因该方法高投入、高污染、低稳定性的弊端, 使得具有高效、专一、低投入、低污染等^[1]优点的微生物转化法在生产焦性没食子酸的过程中得到利用。微生物转化法是利用微生物代谢过程中产生的某种或者某一系的酶对底物的特定部位或者基团通过催化

反应生成所需产物^[2], 即筛选出的微生物可产生没食子酸脱羧酶(Gallic acid decarboxylase, GAD), 将没食子酸的羧基脱去, 生成焦性没食子酸。

目前, 国外有研究证实, 某些微生物如 *Aspergillus niger*^[3,4]、*Aspergillus spec.*^[5]、*Moulds*^[6]、*Aerobacter aerogenes* NCW^[7]、*Rhodopseudo monas spec.*^[8]、*Pseudomonas spec.*^[9]、*Gliocladium roseum*^[10]、*Escherichia coli*^[11] 可以产生脱羧酶而将多羟基苯甲酸羧基脱去^[12], 一些微生物可以在特定的培养基上产生高活性 GAD, 将没食子酸降解成焦性没食子酸。Yoshida H^[13] 等利用柠檬菌株 (*Citrobacter sp.* 64-1) 在厌氧条

收稿日期: 2015-11-27 接受日期: 2016-03-23

基金项目: 国家 863 项目(2014AA021802); 国际合作项目(中俄项目 2014DFR31300)

* 通讯作者 Tel: 86-25-85482471; E-mail: wangczl@sina.com

件下降解没食子酸可得到产率高达 97.4% 的焦性没食子酸。Kumar RA 等^[14]采用固定柠檬酸杆菌 (*C. freundii* TB3) 生物反应进行连续发酵没食子酸可得到产率高达 98.5% 的焦性没食子酸。Soni M 等^[15]利用分离得到的一种肠杆菌 (*Enterobacter* spp.) 可得到纯化率 14.48% 的高活性 GAD。此外, Spiros 等^[16]利用基因工程菌 (*Enterobacter coli* RB791 serA₊; aroB/pSK6.234) 可得到产率高达 93%~97% 的焦性没食子酸, 但该方面的研究国内却鲜有报道。

由于蛋白质通常是以复杂的混合物形式存在, 提取过程中为保持其天然活性, 需要以溶解的形式把它从生物载体中释放出来, 操作复杂, 给分离纯化 GAD 及其结构鉴定的研究增大了难度。为了填补国内这方面研究的空白, 给后续实验提供参考, 本部分试验首先建立了 GAD 蛋白含量的测定方法, 然后利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析、透析、SDS-PAGE 聚酰胺凝胶电泳、DEAE 纤维素树脂、葡聚糖凝胶等对没食子酸脱羧酶进行分离与纯化, 并对纯化分离前后 GAD 的纯化程度与酶活进行测定, 最后采用 MALDI-TOF-MS 等技术对没食子酸脱羧酶进行初步鉴定, 为以后焦性没食子酸的生物制备提供借鉴和参考。

1 原料、试剂及仪器

试剂: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、DEAE-Cellulose 纤维素树脂、G-100 葡聚糖凝胶、CHCA、乙腈、三氟乙酸, 均购自美国 Sigma 公司, 均为分析纯; 电泳溶液的配制参考文献^[17]。

菌种: 产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 由中国工业微生物菌种保藏管理中心保藏。

粗酶液制备: 经过试验及文献参考^[15,18,19]可知, 没食子酸脱羧酶 (GAD) 为胞内酶, 制备粗酶液的方法如下: 为保证实验的可重现性以及后续工作的可持续性, 将最优工艺^[20]下的菌体细胞用含 1 mM 二硫苏糖醇、50 mM 硫代硫酸钠的磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 清洗 2 次, 4 °C 下超声粉碎 45 min (超声 5 s、间隔 5 s), 4 °C 下离心 20 min (10000 rpm), 即从发酵液中提取得到 100 mL 粗酶液, 存于 4 °C 下备用。

仪器: LC-20AT 型高效液相分析仪, 岛津 (中国) 有限公司; 20 PR-520 冷冻离心机, 日本日立公司; HD-3 紫外检测器, 上海沪粤明科学仪器有限公司; ACPHAI-4 冷冻干燥机, CHRIST 公司; MALDI-TOF/TOF 检测器 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Ana-

lyzer, ABI (Foster City)。

2 实验方法

2.1 GAD 的测定方法

2.1.1 考马斯亮蓝法

分别吸取 5 mg/mL 牛血清白蛋白标准品 0、10、20、40、60、80、100 μL 于 5 mL 的容量瓶中, 各加入 4 mL G250 试剂后蒸馏水定容、摇匀、室温静置 5 min, 595 nm 波长下测定上清液的吸光度值吸光度值为纵坐标, 标准品浓度作为横坐标, 绘制标曲。

准确度: 将待测蛋白样品, 然后将它稀释到一定的浓度, 取 4 个 5 mL 的容量瓶, 向其中的 3 个分别加入 1 mL 上述样品溶液和浓度为 1 mg/mL 的牛血清白蛋白标准品 0.5、1.0、2.0 mL, 取 G250 试剂定容后、摇匀后, 先静置 5 min, 然后再在 595 nm 波长下测定样品的吸光度值。

精密度: 分别取 3 个 5 mL 的容量瓶, 分别向其中加入样品各 2 mL, G250 试剂定容、摇匀后, 先静置 5 min, 然后再在 595 nm 波长下测定样品的吸光度值。

2.1.2 双缩脲法

分别吸取 4 mg/mL 的四肽标准品 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mL 于 10 mL 容量瓶, 分别加入 2 mL 双缩脲试剂 A 与适量 B, 蒸馏水定容、搅匀、静置 30 min, 540 nm 波长下测定上清液的吸光度。以吸光度值纵坐标, 标准品浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

准确度: 取 4 个 10 mL 的容量瓶, 分别加入适量的稀释到一定浓度样品溶液 2 mL, 3 份分别加入 0.5、1.0、2.0 mL 的 4 mg/mL 的四肽标准品, 其余 1 份空白, 再在 4 个容量瓶中分别加入双缩脲试剂 A 和 B, 在 540 nm 波长下测定吸光度值。

精密度: 取 3 个 10 mL 的容量瓶, 分别加入 2 mL 样品溶液, 分别加入双缩脲试剂 A 和 B, 在 540 nm 波长下测定吸光度值。

2.2 GAD 酶活的测定方法

GAD 酶活的测定采用香草醛法^[21,22], 同时根据实验做出相应调整。即将 1 mL 纯化酶液加入到含有 3 mL 0.4% 没食子酸以及 2 mL 50 mM pH 5.0 醋酸盐缓冲溶液的试管中, 30 °C 下反应 10 min, 用终止剂终止反应, 冷却至室温后, 然后 500 nm 下比色法测其中焦性没食子酸的吸光度值^[15]。其中, 终止剂为 1% 的香兰素溶于 70% 的硫酸溶液, 以加入酶

液开始反应时的吸光度值为空白对照,以每分钟生成 1 μmol 的焦性没食子酸为一个酶活力单位,计算 GAD 的活力。

2.3 GAD 的分离纯化

2.3.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀 GAD

由于粗酶液中 GAD 含量有限,为了达到较好的沉淀效果,采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 固体进行盐析,考察了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度(0.2、0.3、0.4、0.5、0.55、0.6、0.7、0.8 g/mL)、沉淀时间(5、8、12、18、24 h)、pH (pH=4、5、6、7、8、9)等因素对盐析效果的影响。

2.3.2 膜分离技术

根据粗酶液中的蛋白质的大概范围及已有文献^[15,19]中 GAD 的大概范围在 50 ~ 70 kD,选择透过蛋白分子量分别为 35 kD 的透析膜将大分子的蛋白质与小分子的无机盐进行分离。

2.3.3 DEAE-Cellulose 树脂层析

分别称取 0.2 g 的 DEAE-Cellulose 树脂于 10 mL 的离心管与粗蛋白样液混合,加入不同 pH 的缓冲液(pH=3、4、5、6、7、8)、不同 pH 值的洗脱液(pH=4、5、6、7、8、9)、不同离子强度的 NaCl 溶液(0.0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.8、1.0 mol/L)、树脂的饱和吸附量(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 粗酶液),搅拌均匀,常温下振荡 2 h、离心,测定上清液的吸光度值,对 DEAE-Cellulose 树脂吸附效果的影响。

以 DEAE-cellulose 为基质的纤维素树脂柱(规格:30×300 mm),填料高度为 15 cm,上样量为 10 mL(约 20 mg),pH 值为 7.5 的磷酸盐缓冲液淋洗至 pH 值稳定,然后用 0.4 mol/L pH 值为 5.5 的 NaCl 溶液洗脱(2 mL/min 速率),每次收集 5 mL,280 nm 下测吸收度,绘制洗脱曲线。

2.3.4 凝胶层析纯化

本实验将选择 Sephadex G-100 来截留在 40 ~ 150 kD 之间的蛋白。分别装柱后(规格:200×20 mm),其填料高度为 15 cm。上样上述洗脱液(50 mL),去离子水洗脱(速率 1 mL/min),每次收集 5 mL,280 nm 下测吸收度,绘制洗脱曲线。

2.4 GAD 的结构鉴定

2.4.1 GAD 样品电泳

DEAE-Cellulose 树脂层析和凝胶层析纯化后的蛋白质样品通过电泳实验,检测蛋白质条带。

2.4.2 MALDI-TOF/TOF 分析样品条带蛋白质

首先将待测蛋白进行脚内酶解,然后抽提出酶

解肽段,利用 Zip Tip 脱盐得酶解样品;冻干后,取 2 μL ,加 20% 乙腈复溶;取 1 μL 样品,点于样品靶上,让溶剂自然干燥;取 0.5 μL 过饱和 CHCA 基质溶液(溶剂为 50% ACN,0.1% TFA)点至对应靶位上并自然干燥;样品靶经氮气吹净后放入仪器进靶槽;进行质谱分析,光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器,加速电压为 2 kV,采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据,PMF 质量扫描范围为 800 ~ 4000 Da,选择信噪比大于 50 的母离子进行二级质谱(MS/MS)分析,每个样品点上选择 8 个母离子,二级 MS/MS 激光激发 2500 次,碰撞能量 2 kV,CID 关闭;实验结果采用软件 4800 Explore™ 分析,在 Mascot 数据库进行检测比对。

3 结果与讨论

3.1 GAD 测定方法

考马斯亮蓝法的标准曲线方程为: $Y=4.8748X-0.0225$,相关系数 $R^2=0.9922$;加样回收率实验中,平均回收率为 91.1%,RSD=7.67%,说明此法准确度也一般;精密度实验中,RSD 重复性=0,说明该方法具有较高的重现性。双缩脲法的标准曲线方程为: $Y=0.2476X+0.0003$, $R^2=0.9993$,线性良好;加样回收率实验中,回收率的 RSD=8.44%,说明双缩脲法测多肽含量准确度不高;精密度实验中,RSD=0.55%,准确度一般,不过精密度很高。因此,根据结果及实验操作,后续实验测定选择考马斯亮蓝法进行。

3.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀 GAD

由表 1 可以看出, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度在 20% ~

表 1 盐浓度对盐析的影响

Table 1 Effect of salt concentration on salt-out

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Ammonium Sulfate(g)	蒸馏水 H_2O (mL)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度 Concentration of APS(%)	沉淀量 Amount of Precipitate
2	10	20%	-
3	10	30%	*
4	10	40%	**
5	10	50%	***
5.5	10	55%	****
6	10	60%	*****
7	10	70%	*****
8	10	80%	*****

注:* 沉淀量,* 越多,沉淀量越大。

Notes:* indicated the amount of precipitate;more *,more precipitate.

60%时絮状物的量呈持续增加的趋势,在60%~80%之间时沉淀量基本趋于平稳,当只沉淀一次时,可选60%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,两次沉淀可选择浓度为60%和70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,才能够尽量的将蛋白质沉淀下来。由图1可知,蛋白质的沉淀量随着盐析时间的增加呈上升的趋势,但在时间大于32 h后,沉淀量波动不大,故选32 h为最佳盐析蛋白质的静置时间;缓冲液pH值能显著影响盐析的效果,沉淀量在pH值为6时最大,大于7时明显下降,因此,最佳盐析pH值为6。

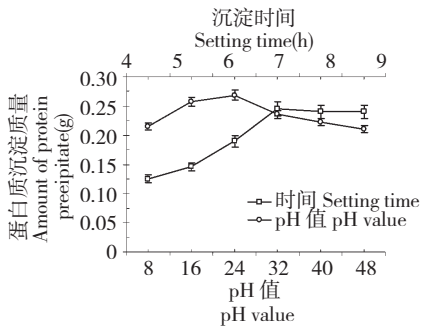


图1 时间和pH对盐析的影响

Fig. 1 Effect of time and pH-value on salt-out

3.3 透析膜分离GAD

采用35 kD的透析膜过滤,可以截留住大分子,去除小分子的杂质。由图2可知,透析液中蛋白质的含量随着时间的增加呈下降的趋势,在前6 h,下降的不明显,8~16 h时急剧下降,后趋于平稳。但是,样液是能够在16 h内完全通过膜的,所以,处理的最佳时间在12~16 h的范围内选择。

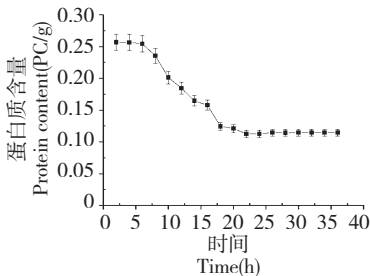


图2 膜分离时间对蛋白质含量的影响

Fig. 2 Effect of membrane separation time on protein content

3.4 DEAE-Cellulose 树脂分离纯化GAD

3.4.1 DEAE-Cellulose 树脂静态解吸附

如图3所示,不同pH值的缓冲溶液下,树脂对蛋白质吸附量的影响,离心后上清液的吸光值最低的在pH值为6.5的管中,此时树脂对蛋白质的吸附量最

大;随着洗脱液离子强度的增加,树脂的解吸附作用在NaCl溶液浓度为0.4 mol/L时最佳,可作洗脱剂。

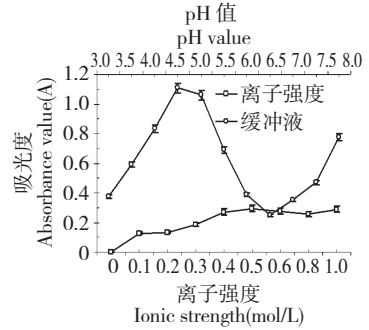


图3 缓冲液pH值和离子强度对树脂解吸附的影响

Fig. 3 Effect of ionic strength and pH of buffer solution on resin adsorption

由表2可以发现,洗脱液的酸碱度并不能显著影响树脂的解吸附,但整体上,只在碱性条件下才有一定的解吸附作用;由表3可以发现,蛋白质的吸附量随着样品量的增加先增大后减小,但在GAD样品溶液达到1.5 mL时,吸光度却达到最小,说明此时树脂对蛋白质的吸附能力已达到最大,所以,计算得出此种树脂对GAD蛋白质的饱和吸附量是1.5 mL/0.2g,即2.838 mg/g。

表2 洗脱液pH值对树脂解吸附的影响

Table 2 Effect of pH of eluent on desorption of resin

洗脱液 pH Eluent pH	吸光度值 Absorbance (A)
4.0	0.082
5.0	0.085
6.0	0.130
7.0	0.119
8.0	0.189
9.0	0.175

表3 树脂饱和吸附量的确定

Table 3 Determination of saturated extent of adsorption

树脂饱和吸附量 Saturated extent of adsorption (mL)	0.5	1	1.5	2	3
吸光度值 Absorbance (A)	0.158	0.084	0.068	0.169	0.353

3.4.2 DEAE-Cellulose 树脂动态解吸附

待纯化的GAD粗酶液经盐析、透析后,进一步经两根相同的DEAE-Cellulose柱纯化的结果如图4所示。其中,图4(a)表示第1根DEAE-Cellulose分

离柱的结果,说明:样品溶液经过此分离柱后,在280 nm的波长下,在洗脱到第13管(即洗脱溶液体积达到65 mL,以此类推)之前,吸光度的波动不大;在第14管到第18管之间,其吸光度达到峰值,第15管与第17管时,具有较大的吸光度值,说明此时的蛋白质含量最多,因此可以将此时的溶液作为下一步纯化分离的样品溶液;在第19管之后,吸光度值急剧减小,之后的波动也不明显,说明此后的溶液中蛋白质含量较少;故此次的柱分离取用第15管和第17管。图4(b)为同样的样品溶液在经过第2根

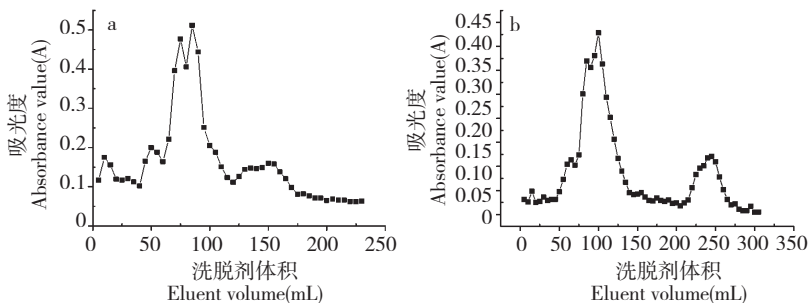


图4 第一根柱(a)及第二根(b) DEAE-Cellulose 分离柱洗脱分离结果

Fig. 4 Elution and separation results of first(a) and second(b) DEAE-Cellulose column

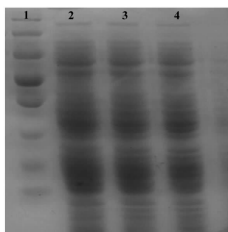


图5 DEAE-Cellulose 分离柱分离结果的电泳图

Fig. 5 Electrophoresis plot of elution and separation of DEAE-Cellulose

注:1 是 Marker,2 和 3 分别是第 1 根柱的第 15 管和第 17 管,4 是第 2 根柱的第 21 管

Note: lane 1 was Marker, lane 2 and 3 were the 15th and 17th of the first column, lane 4 was the 21th of the second column

3.5 葡聚糖凝胶分离 GAD

由 DEAE-Cellulose 分离柱的分离结果,该部分的样品溶液为第 1 根柱的第 15 管和第 17 管,以及第 2 根柱的第 21 管,其经过 G-100 葡聚糖凝胶层析分离后的洗脱结果分别如图 6(a~c)所示,可以发现,它们的洗脱结果都相对较好,图 6(a)中在洗脱到第 3 管时,吸光度值达到最大,且相邻的样品溶液的吸光度比较小,说明此时的蛋白质含量较高,且分离效果很好,尽管后来的样品中出现了小范围的波动,产生了另外的吸收峰,但相对来说,第 3 管的吸

光度值仍是最大的,说明该样品可以作为进行下一步分析的样品溶液;图 6(b)中在洗脱到第 3 管时,吸光度值达到最大,且相邻的样品溶液的吸光度比较小,说明此时的蛋白质含量较高,且分离效果很好,尽管后来的样品中出现了小范围的波动,但整体上看在峰值之后是趋于稳定的,因此此时的第 3 管可以作为进行下一步分析的样品溶液;图 6(c)中在洗脱到第 3 管时,吸光度值达到最大,相邻的 10 mL 即第 2 管时,其吸光度值与第 3 管的接近,说明两管的蛋白质含量差不多,其他管的吸光度值相对来说虽有轻微的波动,但整体上看在峰值之后也是基本趋于稳定的,因此,该样品的第 2 管和第 3 管溶液可以作为下一步分析的样品溶液。综上,经过葡聚糖凝胶层析柱洗脱分离后,取得的可以进行下一步分析的样品溶液为图 6(a)的第 3 管,图 6(b)的第 3 管,图 6(c)的第 2 和第 3 管。

DEAE-Cellulose 分离柱后的结果,说明在洗脱到第 16 管之前和大于第 28 管之后,溶液的吸光度值都有相对较小的波动,在第 21 管时达到最大的吸光度值,因此此时的溶液作为下一步分离纯化的样品溶液。综上,在经过了该分离柱后,得到了 3 个样品溶液,即第 1 根柱的第 15 管和第 17 管,以及第 2 根柱的第 21 管,其电泳分析结果如图 5 所示,3 个泳道的图谱基本相同,说明其溶液成分基本相同,另外,由于泳道背景较重且有较多的细线,说明溶液含有较多的杂质还需要进一步的分离纯化。

由表 4 可知,经过微生物产气肠杆菌的转化,在其细胞内产生的 GAD 经过以上步骤,即粗提、硫酸盐沉淀、透析、DEAE 纤维素层析、G-100 葡聚糖层析的过程中其总蛋白、总活性、专有活性、纯化系数及得率,由此可知,GAD 最终的纯化得率 20.25%,相比 Zeida^[18] 的 11% 和 Soni M^[19] 的 14.48% 有所提高。

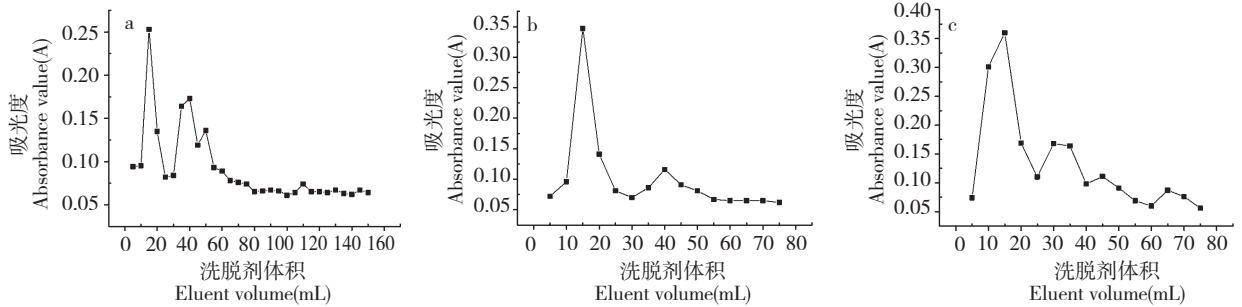


图6 葡聚糖凝胶层析分离柱洗脱结果

Fig. 6 Elution and separation results of Sephadex column

注:(a)、(b)分别是第一根纤维素柱洗脱后的第15管、17管;(c)是第二根纤维素柱洗脱后的第21管

Note:(a),(b) was the 15th and 17th elution results of the first Cellulose column, respectively;(c) was the 21th elution results of the second Cellulose column

表4 GAD从肠杆菌中的纯化过程

Table 4 Purification scheme for GAD from *Enterobacter* spp.

纯化步骤 Purification steps	总蛋白质量 Total protein(mg)	总活性 Total activity(U)	专有活性 Specific activity(U/mg)	纯化系数 Purification fold	得率 Yield(%)
粗提 Crude extract	37.84	200.54	0.20	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ (60% -70%) precipitated	6.15	162.94	1.09	5.45	81.25
透析 Dialysis	1.66	75.02	1.76	8.80	37.41
DEAE 纤维素柱 DEAE Cellulose	0.74	62.83	3.15	15.75	31.33
葡聚糖凝胶柱 Sephadex	0.36	40.61	3.52	17.260	20.25

3.6 GAD 纯化样品的电泳分离

为了更清楚的说明上述样品溶液的成分,也为下一步进行氨基酸一级结构鉴定进行准备,分别将上述样品溶液在 SDS-PAGE 电泳上进行谱图分析,结果如图 7 所示,可以发现,除了泳道 5,其余的泳道虽然样品不同,但都有一条色谱带特别明显,位于 Marker 中的第 2 和第 3 条带即 130 kD 和 100 kD 之

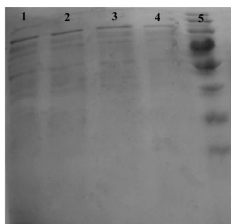


图7 葡聚糖凝胶层析分离柱洗脱结果的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE electrophoresis plot of elution and separation of Sephadex gel

注:1 是图 6(a)的第 3 管,2 是图 6(b)的第 3 管,3 和 4 分别是图 6(c)的第 2 和第 3 管,5 是 Marker 对照品)

Note:lane 1 was 3th of Fig. 6(a), lane 2 was 3th of Fig. 6(b), lane 3 and 4 were respectively 2th and 3th of Fig. 6(c), lane 5 was Marker

间,其分子量约为 115 kD;除此之外,在泳道 1 中可以很明显的看出,在 Marker 的第 3 和第 4 条带即 100 kD 和 70 kD 之间也有 2~3 条条带,在第 4 和第 5 条带即 70 kD 和 50 kD 之间也有一条条带,其分子量约为 60 kD,该分子量与文献^[18]中报道纯化出的 GAD 的分子质量为 57 kD 十分接近,定为蛋白条带 belt1。

3.7 GAD 蛋白条带的质谱结构解析

应用 MALDI-TOF-MS 对 GAD 蛋白条带 belt1 进行肽段测序,结果发现该蛋白条带共 102 条肽段,对其中 5 个离子强度较大,即 m/z 分别为:988、1050、1206、1786、1928 的肽段采用 MS/MS 进一步的分析,对比 BLAST,将这 5 条肽段序列在 NCBI 数据库中分析同源性蛋白质,结果匹配到蛋白质 gi/334732950,物种为 enolase (*Enterobacter aerogenes* KCTC2190),即特异性烯醇化酶(产气肠杆菌 KCTC2190)匹配度 53(大于 42 即成功鉴定),分子量 45.62 kD,等电点 5.19。因此可以推测 GAD 蛋白与已知蛋白 gi/334732950 具有一定的相似性。但是,GAD 蛋白质的全序列在 MASCOT 中的匹配结

果如表 5 所示,其匹配到的序列组由下划线标出,结果表明,匹配序列仅占整个序列的 3%。因此,我们

认为已知蛋白质 gi/334732950 与 GAD 蛋白仍存在较大差异,故 GAD 蛋白可能是一种新的蛋白酶。

表 5 belt1 的蛋白全序列
Table 5 Protein sequence of belt1

No.	氨基酸序列 Amino acid sequence				
1	MSKIVKVIGR	EIHSRGNPT	VEAEVHLEGG	FVGMAAAPSG	ASTGCSREALE
51	LRDGDKSRFL	GKGVTKAVAA	VNGPIAQAVL	GkDKDQAGI	DKIMIDL DGT
101	ENKSNFGANA	ILAVSLANAK	AAAASKGQPL	FEHIAELNGT	PGKYSMPVPM
151	ENIINGGEHA	DNNVDIQEFM	IQPVGAPTLK	EAVRMGSEVF	HHLAKVLKSK
201	GMNTAVGDEC	GYAPNLGSNA	EALAVIAEAV	KAAGYELGKD	ITLAMDC AAS
251	EFYKDGKYVL	AGEGNKAFTS	EEFTHFLEEL	TKQYPIVSIE	DGLDESDWDG
301	FAYQTKVLGD	KIQLVGDDL F	VTNTKILKEEG	IEKGIANSIL	IKFNQIGSLT
351	ETLAAIKMAK	DAGYTAVISH	RSGETEDATI	ADLAVGTAAG	QIKTCSMSRS
401	DRVAKYNQLI	RIEEALGEKA	PYNGPKEIKG	QA	

4 结论

本文通过对 *Enterobacter aerogenes* GAD 的分离、纯化,首先考察了不同盐析条件对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀 GAD 蛋白样品的影响,最佳沉淀条件为:若沉淀一次,则最佳 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 60%,若沉淀两次,则可分别选择 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 60% 和 70%,最佳沉淀时间 32 h, pH 6;透析膜分离蛋白时,采用 35 kD 的规格进行过滤,膜处理时间为 12 ~ 16 h;DEAE-Cellulose 树脂层析的最佳的静态吸附条件:缓冲体系的 pH 值为 7.5,树脂饱和和吸附量最大达到 2.838 mg/g,选 0.4 mol/L 的 NaCl 在 pH 6.5 的弱碱性条件下进行洗脱,将 DEAE 的洗脱液利用 G-100 的葡聚糖凝胶进一步纯化,GAD 最终的纯化得率为 20.25%。

应用 MALDI-TOF-MS 对 GAD 蛋白条带进行肽段测序得出:GAD 蛋白与已知蛋白质 gi/334732950 匹配度 53,分子量 45.62 kD,等电点 5.19,可以推测 GAD 蛋白与已知蛋白 gi/334732950 具有一定的相似性,但 GAD 蛋白质的全序列在 MASCOT 中的匹配结果仅占整个序列的 3%。因此,GAD 蛋白与已知蛋白 gi/334732950 仍存在较大差异,可能是一种新的蛋白酶。

参考文献

1 Cao SF(曹淑芬). The research and application of microbial transformation. *Guangdong Sericul* (广东蚕业),2012,46

(2):45-50.

- Wang SY(王身艳),Chen JW(陈建伟),Zhang WX(张蔚学),et al. Effect of i-directional fermentation on the HPLC fingerprinting and paeoniflorin content. *Res Pract Chin Med* (现代中药研究与实践),2009,23(2):6-9.
- Terui G,Enatsu T,Tokaku H. A new decarboxylase specific for 2,3-dihydroxybenzoic acid and the role thereof in the metabolism of salicylic acid by *Aspergillus niger*. *Technol Rep Kansai Univ*,1952,2:283-294.
- Subba Rao PV,Moore K,Towers CHN. o-Pyrocatechuic acid carboxy-lyase from *Aspergillus niger*. *Arch Biochem Biophys*,1967,122:466-473.
- Halvorson H. Formation of resorcinol as an intermediate in the metabolism of 2,4-dihydroxybenzoic acid and its corresponding aldehyde. *Biochem Biophys Res Commun*,1963,10:440-443.
- Butkewitsch W. Uber die umwandlung der Chinasure durch die pilze. *Biochem Z*,1924,145:442-460.
- Pittard AJ,Gibson F,Doy CH. A possible relationship between the formation of o-dihydric phenols and tryptophan biosynthesis by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim Biophys Acta*,1962,57:290-298.
- Proctor MH,Scher S. Decomposition of benzoate by a photosynthetic bacterium. *Biochem J*,1960,76(59):33.
- Ribbons DW,Evans WC. Oxidative metabolism of phthalic acid by soil Pseudomonads(2). *Biochem J*,1960,76:310-318.
- Pettersson G. An orsellinic acid decarboxylase isolated from *Gliocladium rosettm*. *Acta Chem. Scand*,1965,19:2013-2021.

(下转第 1059 页)