

凝胶层析和离子交换层析结合法纯化高盐发酵液中 谷氨酰胺转胺酶

张莉丽^{1,2} 张兰威*¹ 杜明¹ 韩雪¹ 易华西¹ 张英春¹ 张艳禾³ 马微¹

¹(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 哈尔滨 150090) ²(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

³(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室/动物细菌病研究室, 哈尔滨 150001)

摘要 采用凝胶层析和离子交换层析相结合的方法分离纯化高盐培养基中的谷氨酰胺转胺酶, 优化的凝胶层析的条件, 上样量 6 mL, 流速为 0.25 mL/min; 离子交换层析的上样量 50 mL, 流速为 3 mL/min。酶被纯化了 4.22 倍, 比活力达 17.33 U/mg 蛋白, 回收率为 77.5%。液相色谱-串联质谱鉴定、蛋白质数据库比对结果表明, 纯酶与 AAN01353 是同种蛋白质。

关键词 谷氨酰胺转胺酶; 分离纯化; 液相色谱-串联质谱; 凝胶层析; 离子交换层析

1 引言

谷氨酰胺转胺酶(Transglutaminase, EC 2.3.2.13, R-glutaminyl-peptide: amine γ -glutamyl-transferase, 简称 TGase), 又名转谷氨酰胺酶, 是一种催化酰基转移反应的酶, 它催化肽链上的 γ -甲酰胺基(酰基供体)与各种主要氨基酸(酰基受体)进行反应。TGase 可以使食品蛋白质发生交联, 从而改善蛋白质的溶解性、水合性、流变性、乳化性及热稳定性, 通过引入赖氨酸提高蛋白质的营养价值^[1-3]。

1989 年, Ando 等^[4]报道了链霉菌发酵生产、分离纯化 TGase 的方法, 开创了微生物发酵生产此酶的新方法。微生物 TGase 已经从细菌和酵母中分离出来^[5-10], 但是这些微生物合成的酶量小, 发酵液中的比酶活低, 不易于分离纯化。另外, 已有些关于重组菌株表达和纯化 TGase 的报道^[11-14], 虽然它们的产量较高, 但是由于基因工程菌株存在安全性问题, 限制了它在食品工业中的应用。本研究采用凝胶层析结合离子交换的方法分离纯化了高盐培养基中的 TGase, 并利用液相色谱-串联质谱对纯酶作了鉴定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

TU-1800 分光光度计(北京普析通用有限责任公司); 3-30K 冷冻离心机(Sigma 公司); 超滤设备: Millipore Labscale TFF System (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA); 蛋白纯化系统 AK-TA Purifier (Amersham Biosciences); Agilent 6410 液相色谱串联三重四极杆质谱仪。葡聚糖凝胶(Sephadex G-75); 磺丙基琼脂糖凝胶(SP sepharose High Performance); 甲酸(色谱纯, Fisher 公司); 乙腈(色谱纯, Fluka 公司); 水为 Millipore 超纯水; N-CBZ-Gln-Gly, L-谷氨酸- γ -单羟肟酸(Sigma 公司); 链霉菌 TGase 单克隆抗体(Covalab 公司)。

2.2 菌种和 TGase 发酵液的制备

2.2.1 菌种 茂原链霉菌 DSM40587(Streptomyces mobaraensis) 购于日本 NBRC 公司。

2.2.2 培养基 斜面培养基: 高氏一号培养基。种子培养基: 聚蛋白胨 20 g/L, 可溶性淀粉 20 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, 酵母粉 2 g/L, 无水 $MgSO_4$ 2 g/L, pH 7.0。发酵培养基: 聚蛋白胨 30 g/L, 可溶性淀粉 10 g/L, 果糖 10 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, 酵母粉 2 g/L, 无水 $MgSO_4$ 1 g/L, $MgCl_2$ 20.3 g/L, pH 7.0。

2.2.3 TGase 发酵液的制备 用无菌生理盐水将培养于斜面培养基 7 d 的菌丝体洗下, 接种于种子培养基中, 30 °C 振荡培养(200 r/min) 48 h, 按 10% 的接种量接种于发酵培养基中, 30 °C, 振荡培养

2011-11-01 收稿; 2012-03-01 接受

本文系国家自然科学基金(No.30972041/C110602), 黑龙江省自然科学基金(No.ZJN0605-02), 黑龙江省科技厅项目(No.GA07B401-1)和哈尔滨市基金(No.2010RFXXN039)资助

* E-mail: zhanglw@hit.edu.cn

(200 r/min) 96 h。

2.3 TGase 活力和蛋白质浓度的测定

采用比色法测定酶活力,以 N-CBZ-Gln-Gly 为底物,以 L-谷氨酸- γ -单羟肟酸做标准曲线。一个酶活力单位定义为: 37 °C 时,每分钟催化 N-CBZ-Gln-Gly 生成 1 μ mol 单羟肟酸的酶量^[15]。

采用 Bradford 法^[16]测定蛋白质浓度。

2.4 TGase 分离纯化

2.4.1 分离纯化流程 发酵液经滤纸过滤后用 0.22 μ m 滤膜过滤进一步去除菌体制成无菌发酵液; 无菌发酵液浓缩后进行凝胶层析 Sephadex G-75(1.6 cm \times 60 cm) 得到的活性峰过离子交换层析 SP sepharose HP(1.6 cm \times 10 cm) 得到的酶液经 SDS-PAGE 检验纯度。

2.4.2 发酵液浓缩 发酵液经滤纸过滤后,用 0.22 μ m 滤膜过滤,进一步去除菌体,制成无菌发酵液。

(1) 盐析 向无菌发酵液中加入 (NH₄)₂SO₄ 使其终饱和度分别为 10% ,20% ,30% ,40% ,50% ,60% ,70% 和 80%。(2) 乙醇沉淀 向无菌发酵液中加入无水乙醇,使发酵液与乙醇的体积比分别为 1:1 ,1:1.5 ,1:2 和 1:2.5。(3) 超滤 无菌发酵液经截留分子量为 30 kDa 的超滤系统浓缩为初始体积的 1/5。

2.4.3 凝胶层析 (1) 流速 Sephadex G-75 柱用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0) 平衡后,上样量为 6 mL 粗酶液,流速分别为 0.25 ,0.5 和 1.0 mL/min。(2) 上样量 采用最佳流速,上样量分别为 2 ,4 ,6 和 8 mL 粗酶液。

2.4.4 离子交换层析 SP sepharose HP 柱用 A 液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)) 平衡后,上样,用两个柱体积的 A 液洗脱未结合蛋白质,再用 B 液(1 mol/L NaCl-磷酸盐缓冲液) 梯度洗脱结合蛋白质。(1) 流速 上样量为 10 mL,采用 1 ,3 和 5 mL/min 流速对 SP sepharose HP 柱进行洗脱。(2) 上样量 采用最佳流速,上样量分别为 10 ,20 ,30 ,40 和 50 mL。

2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、Western-blot 分析和胶内酶解

蛋白质样品用 SDS-PAGE 法鉴定纯度^[17]。浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 12.5%。

按照文献[18]的方法进行 Western-blot 分析。

切割 SDS-PAGE 凝胶蛋白条带,按照文献[19]的方法进行酶解。

2.6 1D 毛细管反相色谱-电喷雾-线性离子阱质谱(1D Capillary LC-ESI-MS/MS) 分析

A: 0.1% 甲酸溶液; B: 0.1% 甲酸-84% 乙腈溶液。色谱柱以 95% A 平衡后,将酶解抽提后的样本用 A 溶解,自动上样到 C₁₈ Trap 柱,脱盐,在 C₁₈ 反相柱上分离。进样方式: Microsp ray; 检测方式: 正离子; 毛细管温度: 170 °C。梯度设置为: 0 ~ 120 min ,4% ~ 50% B。

2.7 生物信息分析

将质谱获得的原始数据用 SEQUEST 软件搜索 National Center for Biotechnology Information(NCBI) 蛋白质数据库,蛋白质种属选择 Streptomyces,后用 Buildsummary 4.6.4 中 BLOWWORKERS 软件进行数据库搜索,结合凝胶电泳质谱分析学进行蛋白质鉴定,其结果的过滤参数为: 当 Charge+1 ,Xcorr \geq 1.9; 当 Charge+2 ,Xcorr \geq 2.2; 当 Charge+3 ,Xcorr \geq 3.75; 其中 DelCN \geq 0.1。

3 结果与讨论

3.1 发酵液中 TGase 浓缩方法

比较了盐析、醇沉和超滤 3 种浓缩方法对 TGase 酶活得率的影响。结果表明,盐析时,发酵液中加入少量的 (NH₄)₂SO₄(饱和度低于 20%) 时,蛋白质不沉淀; 随着 (NH₄)₂SO₄ 量增加,蛋白质沉淀量升高,同时析出大量盐。醇沉可以除去发酵液中的盐离子,但醇沉得到的酶液不易复溶,并且酶活得率低(数据未列出)。因此,盐析、醇沉均不适宜用来浓缩含有大量 MgCl₂ 的发酵液。采用超滤将发酵液的体积浓缩为初始体积的 1/5,酶活得率为 97.5%(表 1)。

3.2 凝胶层析

目前关于 TGase 纯化的报道一般都是将浓缩后的酶液直接进行离子交换层析。但在本研究中,由于发酵液中含有大量的 MgCl₂,不宜采用离子交换的方法作为层析的第一步。本研究采用 Sephadex

表 1 各纯化步骤中 TGase 含量及纯化倍数

Table 1 Summary of purification of transglutaminase (TGase) from *S. mobaraensis*

纯化步骤 Purification step	TGase 活力 TGase activity (U)	蛋白质含量 Protein (mg)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification (fold)	得率 Yield (%)
发酵液 Fermentation liquid	659.72	160.05	4.12	1.00	100.0
超滤浓缩 Ultrafiltration	643.28	128.83	4.99	1.21	97.5
凝胶过滤 Gel chromatography	636.94	95.99	6.64	1.61	96.6
离子交换层析 Cation exchange chromatography	511.31	29.50	17.33	4.21	77.5

G-75 对目标蛋白质进行初级分离,同时去除大量的盐和色素。

3.2.1 流速的选择 采用不同流速洗脱 Sephadex G-75 柱,得到的蛋白质洗脱曲线见图 1a。当流速为 0.25 mL/min 时,有 5 个明显的蛋白质峰。而当流速为 1 mL/min 时,却只有 4 个峰,并且峰不明显。通过对各个峰中酶活进行分析,发现酶活力集中在第 2 个峰;通过研究不同流速下酶活得率,发现流速越慢,得率越高,当流速为 0.25 mL/min 时,酶活得率最高达 99% (图 1)。

3.2.2 上样量的影响 如图 2 所示,当上样量小于 6 mL 时,酶活得率较高(98%);上样量大于 6 mL 时,酶活得率明显下降。因此确定 Sephadex G-75 层析的最佳条件为:上样 6 mL,流速 0.25 mL/min。

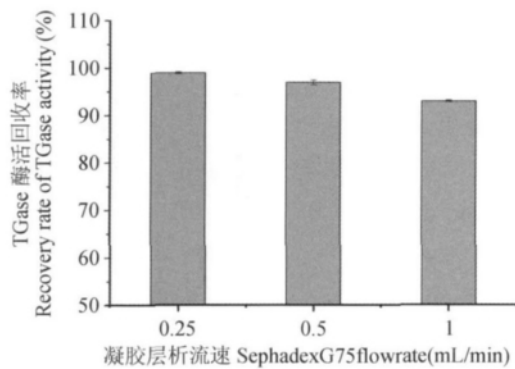


图 1 不同流速的酶活得率

Fig. 1 Effects of different flow rate on yield of TGase activity with different flow rates

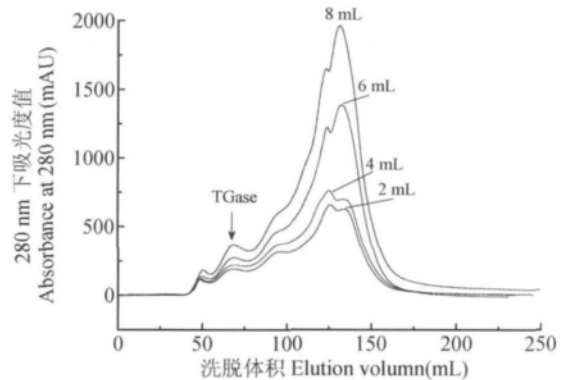


图 2 不同上样量对 Sephadex G-75 层析的影响

Fig. 2 Effects of different sample volume on Sephadex G-75 chromatography

3.3 离子交换层析

经 Sephadex G-75 中分离出来的 TGase 液并不是单一的蛋白质(图 3),需要进一步分离。本实验采用离子交换层析 SP sepharose HP 进行进一步分离。

3.3.1 流速的选择 离子交换的流速会影响蛋白质纯化效果,高流速时,它具有较高的样品通量和生产能力;低流速时,柱效较高。在本研究中分别采用 1.3 和 5 mL/min 的流速进行洗脱,结果表明,当流速为 3 mL/min 时,酶活得率最高(79%) (见图 4)。

3.3.2 上样量的影响 纯化系统上样柱的最大容量为 50 mL,采用不同的上样量,得到的层析图和酶活得率见图 5。随着上样量的加大,酶活得率升高,洗脱峰形变化不大。因此确定上样量为 50 mL。

3.4 各纯化步骤中 TGase 纯化倍数及纯度鉴定

SDS-PAGE 检测各纯化步骤的 TGase 的纯度,结果见图 6。发酵液经超滤浓缩后,杂蛋白未明显减少;通过凝胶层析,大部分杂蛋白被去除;经 SP sepharose HP 层析后,得

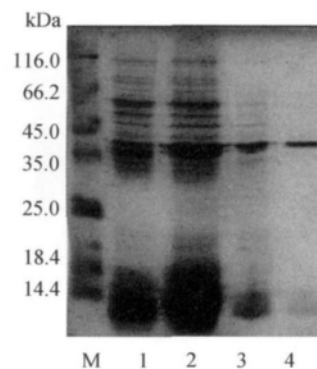


图 3 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 SDS-PAGE of TGase

M, Marker; 1, 无细胞发酵液; 2, 超滤浓缩液; 3, Sephadex G-75 层析后酶液; 4, SP sepharose HP 层析后酶液。

M: standard marker; Lane 1, crude enzyme; Lane 2, TGase after ultrafiltration; Lane 3, TGase after Sephadex G-75; Lane 4, TGase after SP sepharose HP.

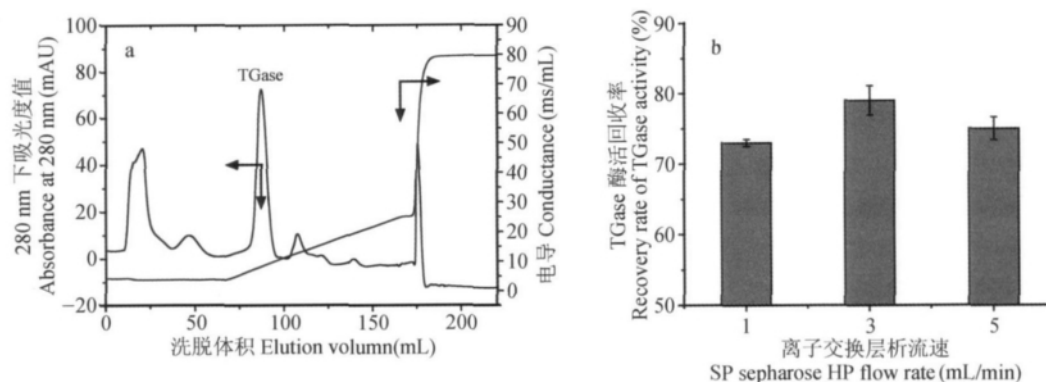


图 4 流速为 3 mL/min 对 SP sepharose HP 层析的影响

Fig. 4 Effects of different flow rate at 3 mL/min on SP sepharose HP chromatography

a. 流速为 3 mL/min 洗脱曲线; b. 不同流速的酶活得率。

a. Elution curves with flow rates of 3 mL/min; b. Yield of TGase activity with different flow rates.

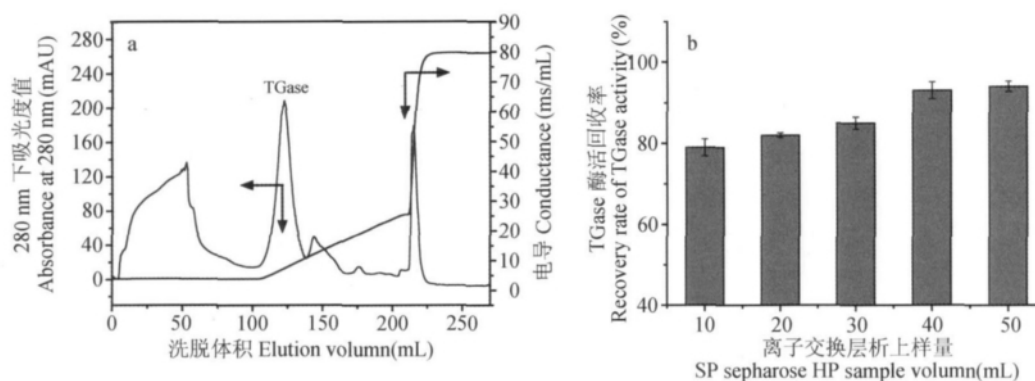


图 5 不同上样量对 SP sepharose HP 层析的影响

Fig. 5 Effects of different sample volume on SP sepharose HP chromatography

a. 上样量分别为 50 mL 洗脱曲线; b. 不同上样量的酶活得率。

a. Elution curves with sample volume of 50 mL; b. Yield of TGase activity with different sample volume.

到单一蛋白带,通过 Quantity One 软件分析分子量为 39 kDa。

纯化各阶段的蛋白质含量、酶活和纯化倍数见表 1。发酵液经超滤、凝胶、离子交换层析后,比酶活由 4.12 U/mg 升高到 17.33 U/mg, TGase 被纯化了 4.21 倍,得率为 77.5%。本方法的得率远高于文献报道(21.1% ~ 76%)^[4, 8, 10, 20]。

3.5 TGase 鉴定

胰酶消化得到的肽段经质谱分析后,得到 85 个肽段,与数据库中的肽段相对比,发现有 23 个肽段与 *S. mobaraensis* 分泌出的蛋白质 (Accession no. AAO48277 and AAN01353) 相同,分别占有所有肽段的 48.05% 和 58.98% (见表 2)。尽管 AAO48277 和 AAN01353 是由同一菌株分泌出来的,并具有相同的氨基酸序列,但它们含有氨基酸的数量不同。AAN01353 含有 334 个氨基酸,远少于 AAO48277 的 410 个氨基酸。根据 Lin 等^[21]的报道,AAO48277 是 TGase 的酶原。SDS-PAGE 的结果表明,纯化蛋白质的分子量约为 39 kDa,与已报道的 TGase 分子量相似,并具有很高的酶活。这说明纯化的蛋白质是具有活力的成熟的 TGase。另外,Western-blot 分析(图 6)证明纯化后的蛋白为链霉菌谷氨酰胺转胺酶。

表 2 TGase 肽序列的质谱分析结果

Table 2 TGase peptide sequences identified by mass spectrometric analysis

NCBI 登录号 Accession No	肽序列 PepCount Sequence	相同肽序列 Unique PepCount	等电点 pI	分子量 M _w	序列覆盖率 Sequence coverage(%)
AAO48277.1	85	23	6.34	45673.07	48.05
AAN01353	85	23	7.92	38167.87	58.98

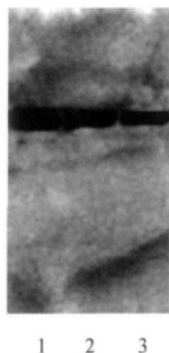


图 6 Western-blot 分析纯化过程中的 TGase

Fig. 6 Western-blot analysis of TGase during the process of purification

1. 超滤浓缩液; 2. Sephadex G-75 层析后酶液; 3. SP sepharose HP 层析后酶液. Lane 1 , TGase after ultrafiltration; Lane 2 , TGase after Sephadex G-75; Lane 3 , TGase after SP sepharose HP.

本研究以高盐发酵液为原料,经超滤浓缩后,利用凝胶层析和离子交换层析对发酵液中的 TGase 进行了分离、纯化,并且用 LC-MS/MS 对纯化的蛋白质进行了鉴定。结果表明,超滤是浓缩高盐发酵液的最佳方法;利用本方法纯化得到电泳纯的 TGase,得率为 77.5%;质谱鉴定和数据库比对结果表明,纯化得到的酶与 AAN01353 是同一蛋白质。

References

- 1 DeJong G A H , Koppelman S J. *J. Food Sci.* , **2002** , 67(8) : 2798 ~ 2806
- 2 Lee H C , Chin K B , Korean J. *Food Sci. An.* , **2010** , 30(6) : 886 ~ 895
- 3 Tang C H , Chen L , Foegeding E A. *J. Agric. Food Chem.* , **2011** , 59(8) : 4071 ~ 4077
- 4 Ando H , Adachi M , Umeda K , Matsuura A , Nonaka M , Uchio R , Tanaka H , Motoki M. *Agric. Biol. Chem.* , **1989** , 53(10) : 2613 ~ 2617
- 5 Klein J D , Guzman E , Kuehn G D. *J. Bacteriol.* , **1992** , 174(8) : 2599 ~ 2605
- 6 Suzuki S , Izawa Y , Kobayashi K , Eto Y , Yamanaka S , Kubota K , Yokozeki K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , **2000** , 64(11) : 2344 ~ 2351
- 7 Iranzo M , Aguado C , Pallotti C , Canizares J V , Mormeneo S. *Microbiol-Sgm.* , **2002** , 148(5) : 1329 ~ 1334
- 8 Gerber U , Jucknischke U , Putzien S , Fuchsbaauer H L. *Biochem. J.* , **1994** , 299: 825 ~ 829
- 9 Duran R , Junqua M , Schmitter J M , Gancet C , Goulas P. *Biochimie* , **1998** , 80(4) : 313 ~ 319
- 10 Cui L , Du G , Zhang D , Liu H , Chen J. *Food Chem.* , **2007** , 105(2) : 612 ~ 618
- 11 Liu X Q , Yang X Q , Xie F H , Qian S J. *Biotechnol. Lett.* , **2006** , 28(17) : 1319 ~ 1325
- 12 Yokoyama K , Nakamura N , Seguro K , Kubota K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , **2000** , 64(6) : 1263 ~ 1270
- 13 Lin S J , Hsieh Y F , Wang P M , Chu W S. *Biotechnol. Lett.* , **2007** , 29(1) : 111 ~ 115
- 14 Washizu K , Ando K , Koikeda S , Hirose S , Matsuura A , Takagi H , Motoki M , Takeuchi K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , **1994** , 58(1) : 82 ~ 87
- 15 Folk J E , Cole P W. *J. Biol. Chem.* , **1966** , 241(23) : 5518 ~ 5525
- 16 Bradford M M. *Anal. Biochem.* , **1976** , 72(1-2) : 248 ~ 254
- 17 Laemmli U K. *Nature* , **1970** , 227(5259) : 680 ~ 685
- 18 Zhang L , Zhang L , Han X , Du M , Zhang Y , Feng Z , Yi H , Zhang Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , **2012** , 93(6) : 2335 ~ 2343
- 19 Xue H , Li B , Zhang J , Wu M , Huang Q , Wu Q , Sheng H , Wu D , Hu J , Lai M. *J. Proteome Res.* , **2010** , 9(1) : 545 ~ 555
- 20 Macedo J , Sato H. *New Biotechnol.* , **2009** , 25: S125 ~ S125
- 21 Lin Y S , Chao M L , Liu C H , Chu W S. *Process Biochem.* , **2004** , 39(5) : 591 ~ 598

Purification of Transglutaminase from High Salt Culture by Gel and Cation Exchange Chromatography

ZHANG Li-Li¹, ZHANG Lan-Wei^{*1}, DU Ming¹, HAN Xue¹, YI Hua-Xi¹,
ZHANG Ying-Chun¹, ZHANG Yan-He², MA Wei¹

¹(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

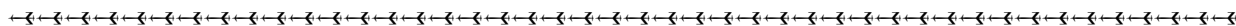
²(Food College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

³(National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract To purify the transglutaminase from high-salt medium, gel filtration combined with ion exchange chromatography method was employed. Two-step chromatographic conditions (flow rate and the sample volume) were optimized. The final sample volume and a flow rate for Gel chromatography were 6 mL and 0.25 mL/min, respectively. Conditions for ion-exchange chromatography were a sample volume of 50 mL and flow rate of 3 mL/min. Enzyme was purified 4.22-fold, the specific activity and the recovery rate were 17.33 U/mg protein and 77.5%, respectively. A comparison between liquid chromatography/tandem mass spectrometric identification and the protein database was carried out and the results showed that the purified enzyme had high homology with AAN01353.

Keywords Transglutaminase; Purification; Liquid chromatography/tandem mass spectrometry; Gel chromatography; Cation exchange chromatography

(Received 1 November 2011; accepted 1 March 2012)



第六届上海国际分析化学研讨会

(The 6th Shanghai International Symposium on Analytical Chemistry)

将于 2012 年 10 月 16 ~ 18 日在上海新国际博览中心举行

主办单位: 中国化学会 协办单位 慕尼黑国际展览集团

会议主席: 汪尔康院士 会议主席执行主席: 林金明教授

同期召开: 2012 中日韩分析化学研讨会 (2012 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry)

会议主题: 分析化学与我们的生活 (Analytical Chemistry and Our Life)

征文范围: 凡未在刊物上发表和未在学术会议上宣读过的反映近期分析化学基础研究、新技术、新方法的发展, 以及各个领域的分析应用论文或综述均可投稿。

(1) 生物领域的分析化学; (2) 医药行业的分析化学; (3) 环境领域的分析化学;

(4) 食品行业的分析化学; (5) 材料分析化学与应用; (6) 纳米技术与分析化学;

(7) 样品预处理方法; (8) 分析化学的新技术、新方法与新仪器

交流类型: 大会特邀报告、分会邀请报告、口头报告、墙报展讲。

会议语言: 英文

有关会议的信息请登陆中国化学会会议网页: <http://www.ccs.ac.cn>

有关展览会的信息请参阅: <http://www.a-c.cn>

会议联系人: 林金明 Tel. 010-62792343, E-mail: jmlin@mail.tsinghua.edu.cn

张 灿: Tel. 010-62568157, E-mail: zcc@iccas.ac.cn