

研究报告

Candida rugosa 脂肪酶同工酶的分离及选择固定化*辛嘉英¹⁾ 徐 毅 李树本 王来来

(中国科学院兰州化学物理研究所, 羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要 采用“界面亲和层析”, 从商品 *Candida rugosa* 脂肪酶 (CRL) 中分离到三个同工酶 (CRL-1、CRL-2 和 CRL-3), 它们在水-有机溶剂双液相体系中催化 (R, S)-萘普生甲酯的不对称水解反应, 具有不同的立体选择性. 分析表明: CRL-1 和 CRL-2 上不同程度地非共价结合有小分子的酸性化合物, 阻碍了其活性位点处疏水腔的完全开放; CRL-3 上不含有该小分子酸性化合物, 活性位点处疏水腔可处于完全开放构象. 据此分别将 CRL 同工酶选择性地固定在不同的载体 (GDX101 和 YWG-NH₂) 上. 通过简单易行的选择吸附步骤, 可同时达到同工酶的分离及固定化目的, 提出了一种对结构上相差不大同工酶分离的便利方法.

关键词 CRL 同工酶, 分离, 界面亲和层析, 选择性固定化

学科分类号 Q556

Candida rugosa 脂肪酶 (CRL) 广泛用于手性化合物的酶法拆分. 由于它由许多立体选择性不同甚至相反的同工酶组成^[1,2], 获取纯同工酶十分必要. 目前利用糖基化程度差异来分离, 还无法得到均一的同工酶^[2]. 脂肪酶疏水腔有“开”和“关”两种构象. 最近 Bastida 等^[3]报道在极低离子强度下, CRL 以一种完全不同于常规疏水吸附的方式被疏水载体吸附. 此时, 其活性中心周围的疏水腔处于“开”构象, 具亲疏水界面特性, CRL 据此被固定在疏水载体上. 由于活性中心周围疏水腔构象上的轻微差异是引起立体选择性不同的主要原因, 而该固定化方法又是靠疏水腔与疏水载体表面的亲和作用, 因此疏水腔构象上有轻微差异的同工酶其吸附行为可能不同. 据此设计出“界面亲和层析”技术, 依据疏水腔开放程度差异将具有不同立体选择性的同工酶分离. 通过分析它们在组成、构象上的差异, 提出了一种通过简易的选择吸附步骤同时达到同工酶分离和固定化目的新方法.

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

CRL (Sigma 公司), DEAE-Sepharose CL-6B 和电泳用试剂 (瑞典 Pharmacia 公司), GDX101 和 YWG-NH₂ (天津化学试剂二厂), CHIREX R-NGLY 和 DNB 手性柱 (美国 Phenomenex 公司),

涂敷 3, 5-二甲基苯基氨基甲酸酯的纤维素手性固定相 (自制), PM10 超滤膜 (美国 Amicon 公司), 快速蛋白质层析仪 (FPLC) 和 LKB2117 多功能电泳仪 (瑞典 Pharmacia 公司), Himac CR21 高速冷冻离心机 (Hitachi 公司), HP1090 高效液相色谱仪 (美国 HP 公司), UV-120-02 分光光度计 (日本岛津).

1.2 方法

1.2.1 CRL 的常规疏水层析: 将 CRL 按 20 g/L 溶解在 25 mmol/L Tris·HCl (pH 7.5) + 1 mol/L (NH₄)₂SO₄ 缓冲液中, 并用同一缓冲液透析过夜, 离心后取 2 ml 上清液上样到采用该缓冲液平衡好的 Phenyl Superose HR 10/10 柱中, 从 1 mol/L 到 0 mol/L (NH₄)₂SO₄ 进行梯度洗脱. 洗脱速度为 60 ml/h, 各组分峰分别收集超滤浓缩后 25 mmol/L Tris·HCl (pH 7.5) 中保存.

1.2.2 “界面亲和层析”法分离 CRL 同工酶: 将 CRL 按 20 g/L 溶解在 25 mmol/L Tris·HCl (pH 7.5) 缓冲液中, 并用同一缓冲液透析过夜, 离心后取 2 ml 上清液上样到采用该缓冲液平衡好的 GDX101 柱 (2.5 cm × 20 cm) 中进行梯度洗脱.

* 中国科学院重点项目资助 (KY95-S1-262).

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (0931) 8836531, E-mail: lzcpen@ns.lzb.ac.cn

收稿日期: 1999-09-03, 修回日期: 1999-12-24

洗脱速度为 30 ml/h, 各组分峰分别收集超滤去异丙醇后 25 mmol/L Tris·HCl (pH 7.5) 中保存。

1.2.3 CRL 同工酶在不同载体上的选择性吸附: 将 100 mg 载体加入到 10 ml 含有 100 mg CRL 的不同离子强度的 Tris·HCl 缓冲溶液中, 室温下搅拌吸附一定时间后离心, 将不吸附部分超滤浓缩后上 GDX101 柱, 比较吸附前后各组分峰面积及整个溶液蛋白质含量变化计算出被吸附各组分含量。

1.2.4 酶催化萘普生甲酯的不对称水解反应: 按文献 [5] 方法进行。

1.2.5 分析方法: 采用 CHIREX R-NGLY 和 DNB 手性柱 HPLC 测定产物萘普生的对映体过量值 (ee_p), (流动相: 0.03 mol/L 醋酸铵甲醇溶液, 流速: 1.0 ml/min, 进样量: 20 μ l)。采用涂敷 3, 5-二甲基苯基氨基甲酸纤维素的手性固定相 HPLC 测定剩余底物萘普生甲酯的对映体过量值 (ee_s), (流动相: 正己烷: 异丙醇 = 95.5: 0.5, 流速: 0.5 ml/min, 进样量: 10 μ l)。由 $C = ee_s / (ee_s + ee_p)$ 和 $E = [\ln(1 - ee_s) (1 - C)] / [\ln(1 + ee_s) (1 - C)]$ 计算转化率 (C) 和立体选择性 (E)^[4]。等电聚焦在 3.5~10 pH 梯度下进行。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳在 10%~15% 梯度胶下进行。蛋白质含量在 280 nm 分光光度法测定。

1.2.6 CRL 同工酶的转化: 向样品溶液中添加 50% 异丙醇, 4℃ 条件下温和搅拌过夜, 超滤去异丙醇后 25 mmol/L Tris·HCl (pH 7.5) 中保存备用。

2 结果与讨论

2.1 CRL 同工酶的分离

极低离子强度下, CRL 的疏水腔处于开放构象。采用“界面亲和层析”技术从 CRL 中分离出包括 3 个同工酶在内的 4 个组分 (图 1), CRL-0 是对疏水界面亲和能力最弱的杂蛋白, CRL-1 和 CRL-2 是与疏水界面亲和能力中等的同工酶, CRL-3 是与疏水界面亲和能力最强的同工酶。较高离子强度下, CRL 的疏水腔处于关闭构象。采用常规的疏水层析技术将 CRL 分成 2 个组分 (图 2), 分别对其在 GDX101 柱上进行“界面亲和层析”分析发现, 峰 1 由 3 个同工酶 (CRL-1、CRL-2 和 CRL-3) 组成, 峰 2 是杂蛋白组分 CRL-0。可见, 各 CRL 同工酶表面疏水区与填料之间的疏水吸附作用是基本相同的, 且均较杂蛋白组分低。

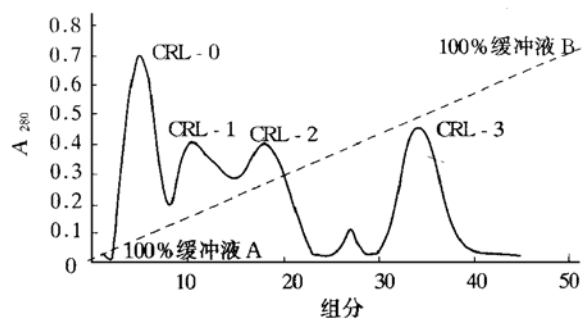


图 1 CRL 的 GDX101 “界面亲和层析”

缓冲液 A: 25 mmol/L Tris·HCl (pH 7.5); 缓冲液 B: 0.5 mmol/L Tris·HCl (pH 7.5) + 5% 异丙醇。

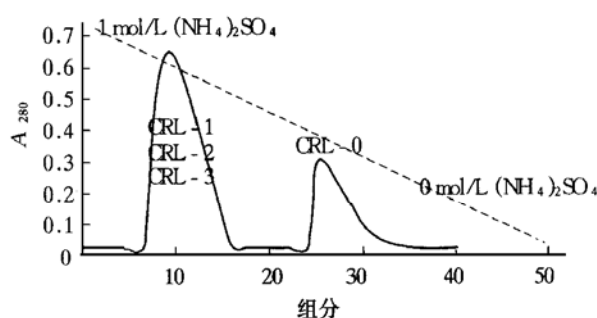


图 2 CRL 的 Phenyl Superose HR10/10 疏水层析

2.2 CRL 同工酶的组成、构象及立体选择性差异

由以上结果推断, 疏水腔处于“关”构象时, 各 CRL 同工酶表面具有基本相同的疏水区; 但疏水腔处于“开”构象时, 不同 CRL 同工酶的疏水腔开放程度是不同的。CRL-3 疏水腔的开放程度最大, CRL-2 次之, CRL-1 最小。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明 3 个同工酶的相对分子质量基本相同 ($62 \times 10^3 \sim 64 \times 10^3$), 等电聚焦显示 CRL-3 等电点最高 ($pI = 5.6$), CRL-2 次之 ($pI = 4.8$), CRL-1 最小 ($pI = 4.2$) (图 3)。用 50% 异丙醇分别处理 3 个同工酶, CRL-3 等电点不变, CRL-1 和 CRL-2 的等电点分别由 4.2 和 4.8 变为 5.6。界面亲和层析发现 CRL-1 和 CRL-2 均转化为 CRL-3 (结果未列出)。由此可见, CRL-1 和 CRL-2 不同程度地非共价结合一些小分子质量的酸性化合物, 导致它们等电点较低, 而 CRL-3 不含有这些酸性化合物。该酸性化合物的结合可能对疏水腔的开放有阻碍作用, 因此等电点越低, 疏水腔开放程度越小。但对疏水腔处于“关”构象时同工酶表面的疏水区影响不大; 异丙醇处理可将该酸性化合物解离, 导致疏水腔开放程度较低的同工酶向疏水腔开放程度较高的同工酶转化。将各组分分别在水-有机溶剂体系中催化萘普生甲酯的不对称水解反应,

发现 CRL-0 无水解萘普生甲酯活性; CRL-1、CRL-2 和 CRL-3 具有不对称水解萘普生甲酯的活性, 但 CRL-3 的立体选择性 ($E = 186$) 明显高于

CRL-1 ($E = 58$) 和 CRL-2 ($E = 62$), 其原因可能是由于活性位点周围疏水腔开放程度不同造成的。

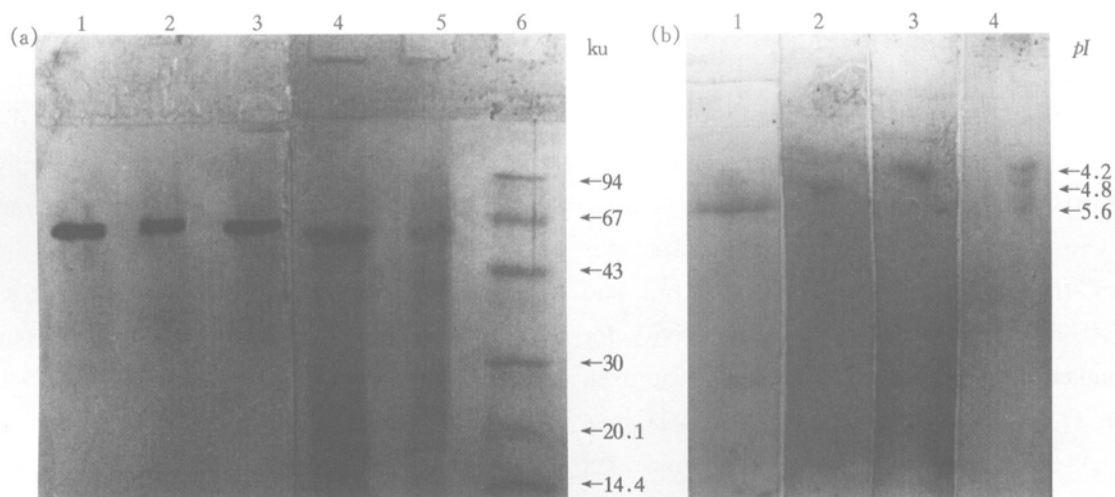


图3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (a) 及等电聚焦 (b) 分析

(a) 1: CRL-1; 2: CRL-2; 3: CRL-3; 4: CRL-0; 5: CRL; 6: 低分子质量标准. (b) 1: CRL-3; 2: CRL-2; 3: CRL-1; 4: CRL.

2.3 CRL 同工酶的选择固定化

采用上述“疏水界面层析”分离 CRL 同工酶, 需要复杂费时的层析操作; 而异丙醇处理转化又极易使酶失活. 通过对 CRL 同工酶在构象和组成上轻微差别的分析, 提出一种利用不同载体选择性吸附 CRL 同工酶以达到对其进行分离纯化及固定化目的的简单方法. 采用疏水性较强的 GDX101 载体对 CRL 进行吸附, 调整离子强度为 0.5 mmol/L Tris·HCl (pH 7.5) 时, 发现其选择性吸附 CRL-3; 采用疏水性较弱但具有阴离子吸附能力的 YWG-NH₂ 载体对 CRL 进行吸附, 调整离子强度, 当 NaCl 浓度为 0.12 mol/L 时, 发现其可对带酸性化合物且疏水腔开放程度较小的 CRL-1 和 CRL-2 选择性吸附 (表 1). 将其分别在水-有机溶剂体系中催化萘普生甲酯的不对称水解反应, 发现经 YWG-NH₂ 载体选择性吸附的 CRL 组分的立体选择性与 CRL-1 和 CRL-2 基本相同, 经 GDX101 载体选择性吸附的 CRL 组分的立体选择性与 CRL-3 基本相同. 本文仅通过一个吸附步骤就达到了立体选择性差别较大的 CRL 同工酶的分离纯化及固定化目的, 为这种在结构组成上差别不大的同工酶的分离纯化提供了一种便利的方法.

表 1 不同载体固定化酶各 CRL 组分含量及立体选择性差异

	含量/%				E
	CRL-0	CRL-1	CRL-2	CRL-3	
CRL	22.0	24.5	30.5	23.0	68
选择固定在 YWG-NH ₂ 上的 CRL	2.2	45.5	50.0	2.3	63
选择固定在 GDX101 上的 CRL	0.0	4.0	7.0	89.0	183

参 考 文 献

- 1 Chang R C, Chou S J, Shaw J F. Multiple forms and functions of *Candida rugosa* lipase. *Biotechnol Appl Biochem*, 1994, **19** (1): 93~ 97
- 2 Lundell K, Raijola T, Kanerva L T. Enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida rugosa* lipases for the resolution of secondary alcohols; the effect of *Candida rugosa* isoenzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, **22** (1): 86~ 93
- 3 Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, *et al.* A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotech Bioengin*, 1998, **58** (5): 487~ 493
- 4 Chen C S, Fujimoto Y, Girdaukas G, *et al.* Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J Am Chem Soc*, 1982, **104** (25): 7294~ 7299
- 5 辛嘉英, 李树本, 徐 毅等. 脂肪酶的固定化及其在有机酶促反应中稳定性研究. *分子催化*, 1999, **63** (2): 103~ 108
Xin J Y, Li S B, Xu Y, *et al.* *J Molecular Catalysis*, 1999, **63** (2): 103~ 108

Separation and Selective Immobilization of *Candida rugosa* Lipase Isoenzymes. XIN Jia Ying, XU Yi, LI Shu Ben, WANG Lai Lai (State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China).

Abstract By “interfacial affinity chromatography” on GDX101 column, commercial *Candida rugosa* lipase (CRL) is fractionated into four fractions containing three isoenzymes (CRL-1, CRL-2 and CRL-3). They have different enantioselectivity for the asymmetric hydrolysis of (R, S) -Naproxen methyl ester in the aqueous-organic solvent biphasic system. As analyzed on SDS -polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing and organic solvent treatment, slight structural difference among these isoenzymes has been found. CRL-1 and CRL-2 are associated noncovalently with low molecular mass

acidic components in different degree, CRL-3 is disassociated with the low molecular mass acidic components. Because of the perhaps hamper of the low molecular mass acidic components, the open extent of hydrophobic pocket around active site on CRL-3 is bigger than on CRL-1 and CRL-2. According to the slight structural difference, isoenzymes with different enantioselectivity for hydrolysis of Naproxen ester have been immobilized selectively on different hydrophobic supports (GDX101 and YWG-NH₂). Via a sample and easily performed selectivity adsorption step, the purification can be combined with the immobilization. This new method seems to be very suitable for an easily separation of such isoenzymes with slightly different structure.

Key words CRL isoenzymes, separation, interfacial affinity chromatography, selectivity immobilization

尖吻蝮蛇毒抗凝血因子II与活化凝血因子X的结合性质

徐小龙 刘清亮¹⁾ 吴双顶
(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

摘要 皖南尖吻蝮蛇毒抗凝血因子II (ACF II) 与活化凝血因子X (FXa) 在钙离子作用下形成了1:1的复合物, 从而延长凝血时间. 这个复合反应是依赖于钙离子的, ACF II在没有钙离子存在条件下不能与FXa形成复合物. ACF II是凝血因子IX或凝血因子X结合蛋白家族中一个新发现的成员, 其相对分子质量为29 468.1. ACF II分子中含有251个氨基酸残基, 其氨基酸组成与这一家族中其他成员十分相似. ACF II在抗凝血反应中存一临界浓度(12 nmol/L), 只有在高于其临界浓度时, 才表现出显著的抗凝血活性.

关键词 结合蛋白, 抗凝血因子, 活化凝血因子X, 钙离子

学科分类号 Q51

蛇毒对凝血系统有广泛的影响, 有的促进血液凝固, 有的则有抗凝作用. 深入研究这一类物质对于进一步认识凝血机理以及开发新的抗栓药物具有重要意义. 路阳等^[1]从皖南尖吻蝮 (*Agkistrodon acutus*) 蛇毒中分离出一种抗凝血因子ACF (anticoagulant factor). 本实验室对ACF的结构和性质已作过一些报道^[2-4]. 最近我们不仅用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法发现ACF与活化凝血因子X (FXa) 在钙离子作用下形成1:1的复合物, 从而延长凝血时间; 而且通过对分离纯化方法的改进从

皖南尖吻蝮蛇毒中分离纯化出一个新的抗凝血因子ACF II (anticoagulation factor II). 因而将前者重新命名为抗凝血因子I (ACF I). ACF I和ACF II都具有显著的抗凝血活性, 都没有出血活性和毒性, 是一种潜在的高效蛇毒抗栓药物.

本文对ACF II的抗凝血机理进行了研究, 发现ACF II与FXa在钙离子作用下也形成了1:1的

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (0551) 3603214, E-mail: qliu@ustc.edu.cn

收稿日期: 1999-08-23, 修回日期: 1999-12-24