

# 半乳糖苷化修饰葡萄糖氧化酶提高其热稳定性

殷海波, 贾楠, 李琳子, 郑小郎, 李任强

(暨南大学生物工程学系, 广东 广州 510632)

**[摘 要]** 利用一种单胺化的半乳糖衍生物,在炭化二亚胺的催化下,对葡萄糖氧化酶(GOD)进行糖苷化修饰,并利用蓖麻凝集素亲和层析分离已修饰的和未修饰的酶。修饰后的酶经荧光光谱和吸收光谱分析,证实其结构发生了变化。酶活性检测证明了修饰后 GOD 的热稳定性增加,在较高温度如在 55 ℃ 下酶活性提高了 7.28 倍。本研究为拓宽 GOD 的应用奠定了基础。

**[关键词]** 葡萄糖氧化酶; 半乳糖; 化学修饰; 热稳定性

**[中图分类号]** Q814 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)03-0305-05

## Modification of glucose oxidase with galactosylation for enhancing its thermostability

YIN Hai-bo, JIA Nan, LI Lin-zi, ZHENG Xiao-lang, LI Ren-qiang

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**[Abstract]** A monoaminated galactose derivative was attached to glucose oxidase (GOD) to modify it via a carbodiimide-catalyzed reaction. Ricinus agglutinin affinity chromatography was first adopted to separate the modified and non-modified enzyme. The modified GOD was confirmed by absorption and fluorescence spectroscopy. The thermostability of modified GOD was enhanced, based on the examination of enzymatic activity. Under a higher temperature, such as at 55 ℃, the catalytic activity of modified GOD has been enhanced as high as 7.28 folds.

**[Key words]** glucose oxidase; galactose; chemical modification; thermostability

葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD)的系统命名为 $\beta$ -D-葡萄糖氧化还原酶(EC 1.1.3.4),能高度专一性地催化 $\beta$ -D-葡萄糖与氧反应,使葡萄糖氧化成为葡萄糖酸和过氧化氢。GOD的催化特性使其具有去葡萄糖、脱氧、杀菌等功能,且安全无毒副作用,所以在食品的加工保鲜、医学等方面都有广泛的应用<sup>[1]</sup>。近年来,GOD更被广泛用作饲料添加剂

等<sup>[2]</sup>。但是 GOD 的应用经常要在高温条件下进行,特别是发酵行业,因此对它进行化学修饰来提高热稳定性就非常重要了。

利用大分子或小分子修饰剂对酶分子中氨基酸侧链进行改造,以获得具有临床和工业应用价值的酶蛋白,是目前应用最广泛的酶化学修饰技术。当前已被广泛应用的小分子化合物的修饰剂有氨基葡

**[收稿日期]** 2008-9-18

**[基金项目]** 暨南大学自然科学基金(640073)

**[作者简介]** 殷海波(1984-),男,硕士研究生,研究方向:蛋白质工程

通讯作者:李任强,教授,Tel: 020-85228392, E-mail: trqli@jnu.edu.cn

葡萄糖、乙酸酐、硬脂酸、邻苯二甲酸酐等,大分子化合物修饰剂有聚乙二醇、聚丙烯酸、聚氨基酸、葡聚糖、肝素等<sup>[3]</sup>。

利用大分子化合物修饰剂修饰酶最主要的缺点是修饰剂很容易发生自身聚合,生成与酶分子差不多大小的化合物,很难从反应体系中除去,这不利于对修饰后酶的动力学进行研究。而利用小分子化合物修饰剂则可克服此缺点,且由于修饰剂分子质量小,不会使修饰后的酶的分子质量变化太大。

Karel Herna'ndez 等<sup>[4]</sup>的研究结果说明,利用糖苷化可以提高酶的热稳定性。半乳糖是一种由6个碳和1个醛组成的单糖,相对分子质量只有180,无毒无害,价格低廉,与酶反应后游离部分经透析便可除去。贺俊峰等<sup>[5]</sup>用半乳糖修饰牛血清白蛋白,提高了蛋白的稳定性;蔡春等<sup>[6]</sup>用半乳糖修饰人血清白蛋白也获得较好的结果。所以,本研究尝试用半乳糖衍生物对 GOD 进行修饰。

由于半乳糖分子质量小, Gal-GOD(结合了半乳糖的 GOD, Gal-GOD)与 GOD(没结合上半乳糖的 GOD)的分子质量大小相差不大,分离它们是本研究的关键。蓖麻凝集素是一种半乳糖凝集素,能与半乳糖发生特异性结合,本研究中利用它的这种特性,将蓖麻凝集素偶联到惰性载体 Sepharose 4B 上作为配基制成亲和层析柱,用于分离纯化 Gal-GOD。

## 1 实验

### 1.1 材料与仪器

半乳糖(Sigma),葡萄糖氧化酶(Sigma),辣根过氧化物酶(Roche),二甲基氨基丙基乙基碳酰胺(EDAC),己二胺(北京奇华盛生物技术有限公司),4-氨基安替吡啉(北京奇华盛生物技术有限公司),氰硼氢化钠(Sigma), Sepharose 4B(Pharmacia), Sepharose CL-6B(Pharmacia),其他的化学试剂都是国产分析纯。

F-4500 荧光分光光度计(Hitachi),日本日立;精密 pH 计(DELTA 320),德国;电子天平(AND HR-120),Precisa;紫外-可见分光光度计(Gold Spectrumlab 54),上海棱光;高速低温离心机,Thermo election;冷冻干燥机(Heto-Holten),丹麦。

### 1.2 末端基团胺化半乳糖的合成

主要参考 Karel Herna'ndez 等<sup>[4]</sup>的方法进行。2 g 半乳糖溶于 10 mL 蒸馏水中,加入 1 mL 己二胺,

搅拌 2 h。再加入 150 mg 氰硼氢化钠,在室温下搅拌过夜,然后冷冻干燥成粉。

### 1.3 葡萄糖氧化酶的化学修饰(Gal-GOD 的制备)

称量 75.7 mg 的葡萄糖氧化酶和 1.828 g 胺化半乳糖,用 4 mL,50 mmol/L, pH 6.0 磷酸氢二钾缓冲液溶解,搅拌 1 h,加入 30 mg EDAC,在室温下再搅拌 1 h,转为 4℃ 搅拌 16 h。透析除去未反应的化学试剂。

### 1.4 蓖麻凝集素的提取纯化

将预冷的磷酸缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2, 含有 0.15 mol/L NaCl)加入到蓖麻子中,然后用高速组织搅拌机搅拌破碎。蓖麻匀浆液在室温下缓慢搅拌 30 min, 4℃ 抽提过夜。离心(4℃, 10 000 r/min, 30 min, 重复 2 次),在上清液中缓慢加入固体硫酸铵至质量分数 60% 饱和度, 4℃ 静置过夜。离心(4℃, 10 000 r/min, 30 min),沉淀物用少量的磷酸缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2)溶解,然后对相同的缓冲液透析,再离心去除沉淀。

由于凝胶载体 Sepharose CL-6B 含大量的  $\beta$ -半乳糖苷键,其可作为蓖麻凝集素的配基。所以将蓖麻粗提液过 Sepharose CL-6B 柱子进行亲和层析。平衡液采用的是 0.01 mol/L, pH 7.2 的磷酸缓冲液,流速 0.50 mL/min。洗脱液是在平衡液中加入 0.20 mol/L 的半乳糖,流速 1 mL/min。收集洗脱峰,冷冻干燥,进行 SDS-PAGE 检测。

### 1.5 偶联蓖麻凝集素到 Sepharose 4B 上,制成蓖麻凝集素亲和层析柱

(1)载体 Sepharose 4B 的活化 将适量 Sepharose 4B 于玻璃烧结漏斗 G-3 中抽干,称 9.6g(湿质量),用 100 mL 0.5 mol/L NaCl 溶液淋洗,用 100 mL 蒸馏水洗,抽干,转移到三角瓶中,然后加 6.5 mL 2 mol/L NaOH、1.5 mL 环氧氯丙烷、15 mL 质量分数 56% 的 1,4-二氧六环,在 40℃ 摇床中活化 2 h。将活化的 Sepharose 4B 转移到玻璃烧结漏斗中,用蒸馏水洗,再用 20 mL 0.2 mol/L pH 9.5  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  缓冲液洗,抽干后立即偶联。

(2)蓖麻凝集素与 Sepharose 4B 的偶联 将活化好的 Sepharose 4B 装入小三角瓶中,用 20 mL 0.2 mol/L pH 9.5  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  缓冲液将少量蓖麻凝集素溶解,倒入三角瓶中(取出 0.2 mL 溶液稀释 10 倍,用吸光度标准曲线法测蛋白质浓度,并计算偶联前蛋

白质质量),将三角瓶放入 40 ℃ 摇床振荡 24 h. 终止后,将偶联后的 Sepharose 4B 抽干,收集滤液,量取体积,用吸光度标准曲线法测蛋白质浓度,并计算偶联后蛋白质质量. 偶联后的 Sepharose 4B 依次再用 100 mL 0.5 mol/L NaCl 洗,100 mL 蒸馏水洗,50 mL 亲和柱洗脱液淋洗,蒸馏水洗至中性,然后转移到小烧杯内,用亲和柱平衡液浸泡 15 min,脱气装柱. 亲和柱平衡液:0.01 mol/L, pH 7.2 的磷酸缓冲液;洗脱液是在平衡液上加 0.20 mol/L 的半乳糖.

### 1.6 Gal-GOD 的分离

进行了化学修饰后的酶样液中存在有未修饰的酶和已修饰的酶(Gal-GOD),要首先把它们分离. 将上述透析后的 Gal-GOD 粗液过蓖麻凝集素亲和层析柱. 平衡液采用的是 0.01 mol/L, pH 7.2 的磷酸缓冲液,流速 0.50 mL/min. 洗脱液是在平衡液中加入 0.20 mol/L 的半乳糖,流速 1 mL/min. 收集洗脱峰,冷冻干燥,进行光学检测.

### 1.7 光学检测

先用考马斯亮蓝法定量 GOD 和 Gal-GOD,将其配成同样浓度的溶液,在紫外分光光度计上进行 250~400 nm 的吸收光谱扫描. 然后在 280 nm 激发光下进行 250~570 nm 的荧光光谱扫描.

### 1.8 修饰酶热稳定性分析

溶液 A:称取 3.5 mg 辣根过氧化物酶(HRP)和 3.5 mg 4-氨基安替吡啉,溶于 20 mL 0.2 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液,加入 1 mL 质量分数 3% 苯酚.

溶液 B:质量分数 20% 葡萄糖溶液

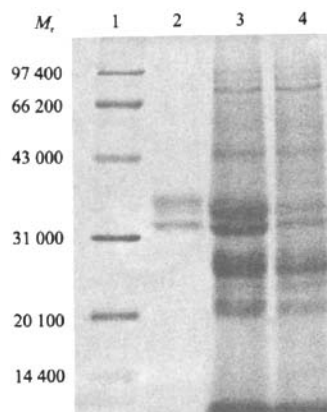
将定量后的 GOD 和 Gal-GOD 分别在 25、35、45、55、65 ℃ 水浴锅中保温 10 min,然后拿出来迅速冷却,在室温下进行活性测定.

取 1.5 mL 溶液 B 和 60 μL 溶液 A,在 1 cm 比色皿中混合,加入 60 μL 的酶,在分光光度计上迅速进行时间扫描,波长为 500 nm. 酶活力单位定义为在上述条件下每分钟引起吸光度值改变 0.001 的酶量为一个活力单位 U. 活性测定是在 pH 5.0 条件下测定的<sup>[7]</sup>.

## 2 结果和讨论

### 2.1 蓖麻凝集素的提取纯化

SDS-PAGE 检测蓖麻凝集素的纯化样品的结果如图 1. 此结果与 G L Nicolson 等<sup>[8-10]</sup>报道的完全一致,说明得到了纯的蓖麻凝集素.



$M_r$ : 相对分子质量; 1: Marker; 2: 洗脱蛋白; 3: 蓖麻蛋白粗提液; 4: Sepharose CL-6B 柱的穿透峰

图1 Sepharose CL-6B 柱吸附的蓖麻蛋白的 SDS-PAGE 图谱

### 2.2 蓖麻凝集素与 Sepharose 4B 偶联的效果

我们先用提取出来的蓖麻凝集素做倍比稀释,做成不同浓度的溶液,分别在分光光度计上测 280 nm 的吸光度,制成蓖麻凝集素标准曲线,线性方程为:  $y = 1.541x + 0.0065$ , 线性系数  $R^2 = 0.9999$ . 用来计算偶联前和偶联后的蛋白量.

偶联前  $A_{280\text{ nm}} = 0.317$  (稀释 10 倍), 体积 19.8 mL, 依线性公式计算得偶联前蛋白质质量为 39.9 mg

偶联后  $A_{280\text{ nm}} = 0.208$  (稀释 5 倍), 体积 18 mL, 依线性公式计算得偶联后蛋白质质量为 11.8 mg

偶联率 =  $(39.9 - 11.8) \text{ mg} / 9.6 \text{ g} = 2.93 \text{ mg/g}$

从偶联率看,偶联后大部分蓖麻凝集素已经结合到载体 Sepharose 4B 上了,以蓖麻凝集素作为配基的亲和层析柱已成功做成.

### 2.3 Gal-GOD 的分离

图 2 显示了修饰酶粗液在蓖麻凝集素亲和层析柱上的分离效果. 因为柱子上结合的蓖麻凝集素有限,能够结合的修饰酶也有限,所以上样量一定要小于柱子的负载量,才能准确反映出修饰酶占总酶液的百分比. 从图上可以看出,在此反应条件下,还有一部分酶没有被半乳糖修饰,在平衡液洗脱下,直接穿过柱子流了出来. 还有大部分酶,只有在换了洗脱液后,才从柱子上洗下来,证明它们确实和蓖麻凝集素发生结合,从而说明这些酶上已带上了半乳糖链. 经光学检测也证明洗脱峰蛋白已被修饰. 从图上来看,洗脱峰面积与穿透峰相比要大很多,利用 N2000 色谱工作站软件进行面积积分,计算出 GOD 的修饰率已经达到 80%.

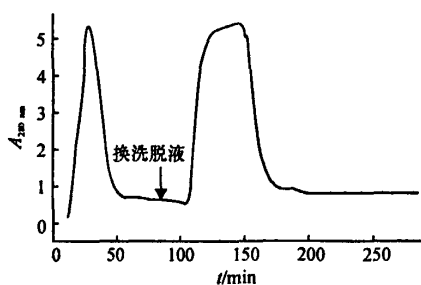


图2 修饰酶粗液在葡聚糖凝胶亲和层析柱上的分离图谱

## 2.4 GOD 修饰前后的光学检测

图3是修饰前后GOD在紫外区的吸收光谱的变化情况。蛋白质在280 nm处有特征吸收峰,此峰的变化可以反映出蛋白质结构的改变。从图3看,GOD除了在280 nm有蛋白质的特征吸收峰外,在380 nm还有一个小的吸收峰。这与M Lepore等人<sup>[11]</sup>关于GOD结构的报道是相符的。但是经过半乳糖修饰后,不但380 nm处的吸收峰不见了,280 nm的吸收峰也变矮变宽了,说明半乳糖链连上了GOD使其发生了一定的结构变化。而荧光光谱变化(图4)也证明了GOD已被半乳糖修饰。

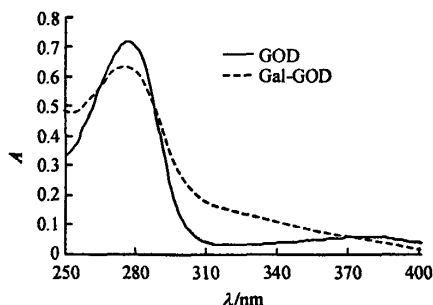


图3 GOD 修饰前后吸收光谱变化

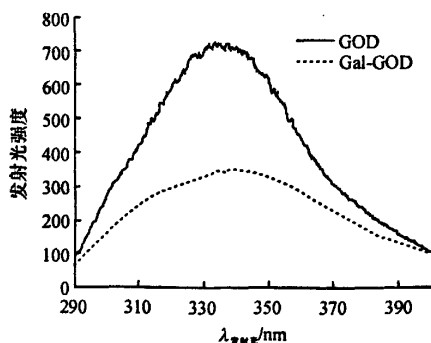


图4 GOD 修饰前后荧光光谱变化

荧光光谱扫描是在280 nm激发波长下进行的,发射峰是在340 nm,这是包裹在GOD内部的色氨酸残基的特征发射峰<sup>[12-13]</sup>。这个发射峰对于研究GOD结构变化非常重要。Saman Hosseinkhani等<sup>[12]</sup>和Ahmed Haouz等<sup>[13]</sup>均用此特征峰来研究GOD修饰前后的结构变化。从图上来看,GOD经修饰后,340 nm发射峰有明显降低,并且发生一定的红移。这是因为修饰后,GOD结构变的更为紧凑,色氨酸被包裹的更深,因此荧光强度降低。修饰后GOD结构变的紧凑,不易伸展失活,这也与下面的热稳定性分析的结果是一致的。

2.5 热稳定性分析

在不同温度条件下修饰前后的GOD的酶活力如图5所示。

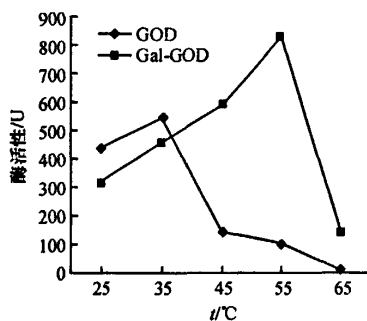


图5 不同温度下GOD和Gal-GOD的酶活性

酶活性测定是在GOD的最适pH 5.0条件下测定的。GOD的最适温度为35℃,由图5可以看出,在GOD的最适温度和最适pH条件下,Gal-GOD的活性比GOD的要低。但随着温度的提升,GOD酶活性迅速下降,到65℃时,已经几乎失活。相反,随着温度的提升,Gal-GOD逐渐体现出其优越性,酶活性逐步提升,并在55℃时达到最大,65℃下,也并未完全丧失酶活性。说明经修饰后,酶的最适温度改变了,热稳定性提高。

酶化学修饰后活力提高的原因,可能是亲水大分子(半乳糖链)的引入与蛋白质分子上的氨基酸基团形成氢键,使维持蛋白质高级结构的氢键受到部分破坏,使底物分子更容易进入活性中心,反应的活化能进一步降低,从而导致酶活力的提高<sup>[14]</sup>。

Gal-GOD在高温下仍能保持活性是蛋白质稳定性提高的缘故。化学修饰酶稳定性提高的原因,可能是由于修饰剂共价连接于酶分子后,使酶天然构象产生一定的刚性,不易伸展失活,并减少了酶分子内部基团的热振动,从而使酶的热稳定性得到提高<sup>[15]</sup>。

### 3 结论

利用一种单胺化半乳糖衍生物对 GOD 进行糖苷化修饰后,能使 GOD 热稳定性提高. 首先利用蓖麻凝集素亲和层析柱,对修饰反应后酶溶液中修饰的和未修饰的 GOD 进行分离得到纯的 Gal-GOD,吸收光谱、荧光光谱分析和热稳定性分析都证明了修饰后 GOD 的构像发生了变化,修饰后 GOD 的热稳定性增加,在较高温度如在 55 °C 下酶活性提高了 7.28 倍. 此种半乳糖衍生物对 GOD 是很好的修饰剂和稳定剂. 本研究为 GOD 的应用提供了更广泛的空间,对于在实践中利用 GOD 具有非常重要的意义.

#### [参考文献]

- [1] 范一文, 吴晓英. 葡萄糖氧化酶的应用研究[J]. 饲料工业, 2007, 28(20): 15-16.
- [2] 张晓云, 刘彦慈, 陈秀如. 新型饲料添加剂葡萄糖氧化酶的研究现状[J]. 兽药与饲料添加剂, 2007, 12(4): 11-12.
- [3] 马晓建, 吴勇, 祝春进, 等. 化学修饰酶的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2004, 6: 7-9.
- [4] KAREL H, LEYDEN F, LEISSY G, et al. Glycosidation of trypsin with end-group activated dextran[J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 1155-1159.
- [5] 贺俊峰, 崔光华, 黄伟. 半乳糖基牛血清白蛋白的制备和测定[J]. 辽宁师范大学学报, 2001, 24(4): 389-391.
- [6] 蔡春, 蔡康荣. 半乳糖修饰人血清白蛋白的质谱分析[J]. 分析测试学报, 2004, 14: 37-38.
- [7] 张国雄, 戴愉勤, 朱天民. PVA-葡萄糖氧化酶膜制备的研究[J]. 生物工程学报, 1991, 7(3): 242-246.
- [8] NICOLSON G L, BLANSTEIN J, ETZLER M E. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interactions with a murine lymphoma [J]. Biochemistry, 1974, 13: 196-204.
- [9] MONTREUIL J, VLEGENTHART J F G, SCHACHTER H. Glycoprotein, Part II [M]. Amsterdam, New York: Elsevier Science BV, 1997: 69-244.
- [10] NICOLSON G L, BLANSTEIN J. The interaction of *Ricinus communis* agglutinin with normal and tumor cell surfaces [J]. Biochim Biophys Acta, 1972, 266: 543-547.
- [11] LEPORE M, PORTACCIO M, TOMMASI E D, et al. Glucose concentration determination by means of fluorescence emission spectra of soluble and insoluble glucose oxidase: some useful indications for optical fibre-based sensors [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 31: 151-158.
- [12] SAMAN H, BIJAN R, HOSSEIN N M, et al. Chemical modification of glucose oxidase: possible formation of molten globule-like intermediate structure [J]. FEBS Letters, 2004, 561: 213-216.
- [13] AHMED H, JEAN M G, BERNARD A. Involvement of protein dynamics in enzyme stability the case of glucose oxidase [J]. FEBS Letters, 2001, 506: 216-220.
- [14] JENE Q, PEARSON J C, LOWE C R. Surfactant modified enzymes: solubility and activity of surfactant-modified catalase in organic solvents [J]. Enzyme Microb Technol, 1997, 20: 69.
- [15] GÓMEZ L, VILLALONGA R. Functional stabilization of invertase by covalent modification with pectin [J]. Biotechnol Lett, 2000, 22: 1191.

[责任编辑:黄建军]