

# 基因工程 $\alpha$ -半乳糖苷酶的制备及其性质研究

高新\* 杨军 李素波 刘泽澎 章扬培

(军事医学科学院野战输血研究所,北京 100850)

**摘要** 在获得可分泌表达  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因工程毕赤酵母菌株的基础上,尝试了基因工程  $\alpha$ -半乳糖苷酶在 5 L 发酵罐中的表达以及从发酵液中纯化  $\alpha$ -半乳糖苷酶的研究。在 4 L 无机盐培养基中接种 0.4 L pPIC9K-Gal/GS115 培养物,最终得到 3.5 L 发酵液。离心所得上清中总蛋白含量为 2.1 g/L。根据发酵液中目的蛋白含量高、杂质少等特点,设计了如下的纯化流程:离心→超滤→阳离子交换层析→脱盐→浓缩。纯化后电泳银染结果呈单一蛋白带,总回收率 41%。通过测定米氏常数等生化性质对重组酶进行鉴定后,完成了人 B 型红细胞的酶解实验。结果表明,从发酵液中纯化的  $\alpha$ -半乳糖苷酶可将 B 型红细胞改造成 O 型红细胞。本研究同时在数量和质量上为  $\alpha$ -半乳糖苷酶在众多领域的广泛应用奠定了基础。

**关键词**  $\alpha$ -半乳糖苷酶,发酵,纯化,血型改造

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0223-04

$\alpha$ -半乳糖苷酶(EC3.2.1.22)属外切糖苷酶类,特异性水解多糖、糖脂、糖蛋白中糖链末端的  $\alpha$ -半乳糖苷键<sup>[1]</sup>。在人、动物、植物及微生物体内均可发现  $\alpha$ -半乳糖苷酶,它被广泛应用于加工农产品、人 B→O 血型改造、清除异种抗原以及治疗遗传性疾病法布莱氏病等<sup>[2-5]</sup>。然而,用生化提取技术无法获得高产量、高纯度的酶。利用 DNA 重组技术,制备可表达  $\alpha$ -半乳糖苷酶的工程菌株是解决这一问题的有效方法。此前,我们报道了咖啡豆  $\alpha$ -半乳糖苷酶 cDNA 的克隆及其在毕赤酵母中的表达<sup>[6,7]</sup>。本文报道基因工程咖啡豆  $\alpha$ -半乳糖苷酶工程菌株在 5 L 发酵罐中的发酵条件与纯化的研究,以期满足我们人 B→O 血型改造的需要。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

德国贝朗公司 BIostat CT-5 型发酵罐;超滤器为美国 Millipore 公司产品;AKTA FPLC,HiTrap SP 阳离子交换柱为瑞典安法玛西亚公司产品。对硝基-苯基- $\alpha$ -D-半乳糖苷酶购自 Boehringer Mannheim 公司;酵母提取物和蛋白胨为 Oxoid 公司产品;消泡剂购自 Sigma 公司。无机盐培养基等均为国产分析纯试剂。抗 A、抗 B 血清为国产试剂。咖啡豆  $\alpha$ -半乳糖苷酶工程菌株 pPIC9K-Gal/GS115 为本室构建<sup>[6,7]</sup>。

### 1.2 实验方法

**1.2.1  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性测定** 将底物对硝基-苯基- $\alpha$ -D-半乳糖苷(PNPG)加入 0.2 mol/L 柠檬酸,0.1 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液中,使其终浓度为 1.25 mmol/L,加入适当稀释的

待测样品,于 37℃ 反应 1 h,加 4 倍体积的硼酸-氢氧化钠溶液(pH 9.8)终止,测定  $OD_{405}$  值,以市售咖啡豆  $\alpha$ -半乳糖苷酶(Sigma, *E. coli* 表达产物)为标准计算发酵液中  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性, $\mu$ U  $\alpha$ -半乳糖苷酶定义为在最适反应条件下,每分钟水解 1  $\mu$ mol/L 的 PNPG 所需的酶量。

**1.2.2 发酵工艺流程** 取 -70℃ 保存的  $\alpha$ -半乳糖苷酶工程菌株 pPIC9K-Gal/GS115 接种于装有 100 mL BMGY 培养基(参见 Invitrogen Manual)的试管中,于 30℃ 培养 18 h,在镜下观察是否有杂菌污染。测定  $OD_{600}$  至 2.0~6.0 时,接种于含 4L 无机盐培养基(参见 Invitrogen manual)的发酵罐中,设定温度 30℃,pH 5.0,调整通气量和搅拌速度以确保溶氧( $DO_2$ )值在 30% 以上,并定时取样测定  $OD_{600}$  及湿重。当溶氧值出现迅速上升至 70% 时开始流加 50% 甘油,流速约为 2 mL/min。10h 后停止流加,饥饿 2h 以消耗残留甘油。待溶氧值再次迅速上升时开始流加甲醇,调整温度为 28℃,逐渐加大并定期调整甲醇流速,维持溶氧值在 20% 以上,并定时留样以便进行蛋白含量及活性分析。

**1.2.3 发酵液定性与定量分析** 发酵液下罐后,离心收集上清。SDS-PAGE 检测是否含有  $\alpha$ -半乳糖苷酶。使用 BCA Protein Assay Kit(Pierce 公司)测定总蛋白含量并按前述方法测定其中的  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性。

**1.2.4  $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化** 发酵液上清用截留分子量为 8kD 的超滤膜,在甲酸-甲酸铵(17.6 mmol/L 甲酸,2.4 mmol/L 甲酸钠,pH 3.8)缓冲体系中超滤,以去除其中的大部分小分

子杂质,并起到更换缓冲液和浓缩的作用。采用 HiTrap SP 5mL 预装柱,以甲酸-甲酸钠溶液充分平衡。超滤截留样品经 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜过滤后上柱,流速为 5 mL/min。洗去未结合蛋白后,分别用含 8%、40% (V/V) 1mol/L NaCl 的甲酸-甲酸钠缓冲液进行洗脱。收集洗脱组分测定蛋白含量及活性,计算酶的比活性。

**1.2.5  $\alpha$ -半乳糖苷酶的鉴定** 纯化后的  $\alpha$ -半乳糖苷酶对 PCS (58.0 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 21.0 mmol/L 柠檬酸 77mmol/L NaCl) 缓冲体系透析过夜,然后用 PEG20 000 进行浓缩。测定浓缩后酶液的蛋白含量与活性,计算比活性。4 $^{\circ}$ C 保存备用。按照经典方法进行  $\alpha$ -半乳糖苷酶的生化性质分析,包括酶的最适反应温度、最适 pH、酶的米氏常数和最大酶促反应速度。

**1.2.6 人 B 型红细胞的酶解改造** 取新鲜人 B 型红细胞,以 PCS 缓冲液洗涤 3 次后,制备 70% 比容的红细胞悬液。加入  $\alpha$ -半乳糖苷酶至终浓度为 100u/mL 26 $^{\circ}$ C 温育 3~4h。酶解结束后使用抗 A、抗 B 血清测定凝集反应,检测 B 抗原的清除效果。

## 2 结果

### 2.1 $\alpha$ -半乳糖苷酶的发酵

通过对种子培养、温度、溶氧值、通气量和搅拌速度等各方面的调整,确立了一套完整的发酵程序。首先,严格检查种子有无杂菌污染及分裂情况,在 OD<sub>600</sub>  $\approx$  4 时,按 1:10 比例进行接种。上罐后,控制生长期温度在 30 $^{\circ}$ C,以保证菌体的快速生长。定时取样镜检,同时测定菌体湿重以监测其生长状态。根据湿重和酶活性随时间变化绘制的曲线如图 1 所示。

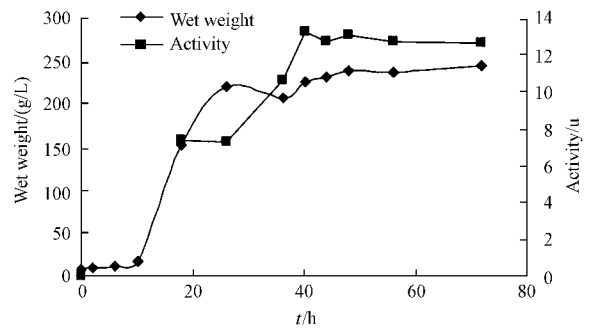


图 1 发酵过程中菌体生长及  $\alpha$ -半乳糖苷酶的产生

Fig. 1 Cell growth and the production of  $\alpha$ -galactosidase during fermentation

由图 1 可见,菌体湿重可达 220 g/L,实现了高密度培养。在接近平台期处,即接种后 48h 开始诱导,诱导期将温度降至 28 $^{\circ}$ C,以减少杂蛋白的表达。发酵液中  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性测定结果显示,随着诱导时间的增加,发酵液中  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性也逐渐升高;诱导后期增加减缓。诱导于 72h 后结束,离心收集发酵液,最终总蛋白含量为 2.1g/L,  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性达到 36u/mL。

### 2.2 发酵液中 $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化与鉴定

通过对不同纯化技术路线的比较,我们初步确立了如下纯化路线:发酵液上清经过滤后再行超滤,截留组分直接上样至经 20mmol/L, pH 3.8 的甲酸-甲酸钠缓冲液平衡的 Hi-Trap SP 阳离子交换层析柱。采用梯度洗脱方法,先用含 8% 1mol/L NaCl 的缓冲液洗杂蛋白,再将 NaCl 浓度升至 40% 洗脱目的蛋白(图 2a)。对纯化过程中各步骤样品的比活性分析结果见表 1。

表 1 发酵液中  $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化

Table 1 Purification of  $\alpha$ -galactosidase from fermentation medium

	Total volume /L	Enzyme activity (u/mL)	Total activity /u	Protein concentration (mg/mL)	Specific activity (u/mg)	Recovery /%
Fermentation medium	3.50	36	126 000	2.1	17.2	
Ultrafiltrate	0.50	179	89 500	8.6	20.8	71.0
Cation-exchange	0.70	87	60 900	2.5	34.8	48.3
Concentrate	0.07	750	52 500	20.9	35.9	41.7

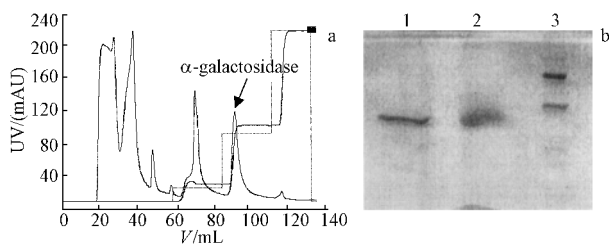


图 2  $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化

Fig. 2 Purification of  $\alpha$ -galactosidase

a. Cation exchange chromatography;

b. SDS-PAGE of  $\alpha$ -galactosidase, stained with silver

1. Fermentation medium;

2. Fraction with  $\alpha$ -galactosidase activity (40% 1mol/L NaCl);

3. Protein marker 94kD 67kD 43kD 31kD 21kD

纯化后  $\alpha$ -半乳糖苷酶 SDS-PAGE 如图 2b 所示,结果表明产物已达电泳纯。

利用双倒数作图法测定重组酶米氏常数为 0.275 mmol/L,略低于天然酶(0.39 mmol/L,如图 3 所示)。重组酶的最适 pH 和最适反应温度与天然酶相一致,分别为 pH 6.5 和 37 $^{\circ}$ C(图略)。

### 2.3 应用 $\alpha$ -半乳糖苷酶进行人 B $\rightarrow$ O 血型改造

用纯化的  $\alpha$ -半乳糖苷酶,进行人 B 型红细胞的酶解实验。结果表明,100u/mL 成品酶可彻底清除人 B 抗原,使凝集反应完全消失(图 4)。

同时,我们还使用纯化的酶对类人 B 血型猕猴的红细胞进行了酶解改造,改造后的红细胞输给类人 A 血型的猕猴未

见明显输血反应(另文报道)。实验证明,中试规模制备的  $\alpha$ -半乳糖苷酶可以作为人 B $\rightarrow$ O 血型改造的工具酶。

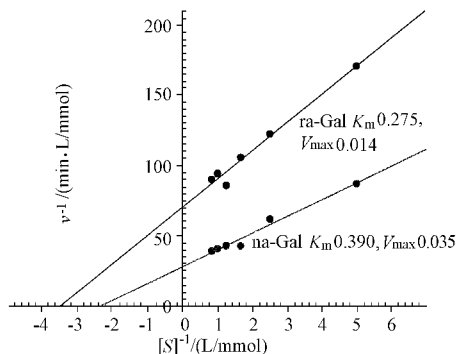


图 3 双倒数作图法测定重组酶及天然酶的米氏常数

Fig. 3 Determination of the Michaelis constant of recombinant and nature enzyme by Lineweaver-Burk plot

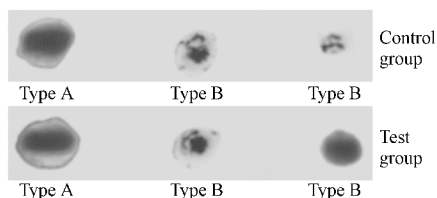


图 4  $\alpha$ -半乳糖苷酶解红细胞前后凝集反应

Fig. 4 Hemagglutins of erythrocyte treated with  $\alpha$ -galactosidase

### 3 讨论

借助基因工程技术,构建可分泌表达  $\alpha$ -半乳糖苷酶的工程菌株,为解决酶在多领域应用中的大量需求问题提供了有效途径。本研究在这一基础上,确立了  $\alpha$ -半乳糖苷酶发酵与纯化的基本技术路线。通过对发酵条件的优化,确定了温度、pH 值、通气量、搅拌速度、溶氧和进料等具体参数。根据文献报导,pH 5.0 条件下毕赤酵母生长最好<sup>[8]</sup>,而  $\alpha$ -半乳糖苷酶在此条件下非常稳定,所以我们将 pH 值始终控制在 5.0 左右。发酵过程中最关键的参数是溶氧值,在生长期,我们

使溶氧值维持在 30% ~ 50%,以利于菌体的快速生长。诱导期通过调整流加甲醇的速度使溶氧值尽量维持在 20% 以上,这样有利于提高酶蛋白的表达。发酵液中杂蛋白含量很少,对下游纯化非常有利。因此,只需串联超滤和离子交换层析即可获得较好的酶纯度。以 PNPG 为底物,测定纯化后重组酶的米氏常数为 0.275mmol/L,比天然酶略低,表明重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶对特异底物的亲和力较高,而其它生化性质无显著差异。本研究结果表明,通过发酵和适当的纯化,可以实现基因工程  $\alpha$ -半乳糖苷酶大规模生产,这为该酶在各个领域的应用奠定了基础。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Dey P M, Pridaham J B. Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases. *Adv Enzymol*, 1972, **36**: 91 - 103
- [ 2 ] Somiari R I, Balogh E. Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal. *Enzyme Microb Technol*. 1995, **17**: 311 - 316
- [ 3 ] Lenny L L, Goldstein J. The production of group O cells. *Biotechnology*, 1991, **19**: 75 - 100
- [ 4 ] Luo Y, Wen J, Luo C *et al*. Pig xenogeneic antigen modification with green coffee bean alpha-galactosidase. *Xenotransplantation*, 1999, **6**: 238 - 248
- [ 5 ] Schiffmann R, Brady R O. New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases. *Drugs*, 2002, **62**: 733 - 742
- [ 6 ] GONG K(宫锋),JI S P(季守平),YANG J(杨军) *et al*. cDNA cloning and sequencing of  $\alpha$ -galactosidase. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences* (军事医学科学院院刊), 1999, **23**(3): 217
- [ 7 ] YANG J(杨军),GONG K(宫锋),JI S P(季守平) *et al*. Cloning and expression of alpha-galactosidase cDNA for seroconversion from group B to O. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学和分子生物学报), 2000, **16**(4): 438 - 442
- [ 8 ] Start A R, Daniel N, Joel T *et al*. Production and purification of recombinant Hirudin expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 1996, **8**: 476

## Fermentation and Purification of Recombinant $\alpha$ -Galactosidase from *Pichia pastoris*

GAO Xin\* YANG Jun LI Su-Bo LIU Ze-Peng ZHANG Yang-Pei

(Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

**Abstract** In order to obtain an adequate supply of  $\alpha$ -galactosidase for research and practical use, the fermentation, purification and identification of the recombinant coffee bean  $\alpha$ -galactosidase were carried out. Baffled flasks containing 100mL BMGY were inoculated with the pPIC9K-Gal/GS115 strain and allowed to grow at 30°C, 250 ~ 300r/min until a maximum optical density at

600nm ( $OD_{600}$ ) between 2.0 to 6.0 was attained. Entire 400mL seed culture was transferred aseptically to the 5-liter fermenter, which contained 4 liter sterilized basal salts medium and 4% glycerol. The batch culture grew at 30°C, pH 5.0 until the glycerol was completely consumed, and a glycerol feed was initiated to increase the cell biomass prior to induction with methanol. The culture was centrifuged at  $8000 \times g$  and the supernatant was collected. Following ultrafiltration, the retentate was balanced in 20mmol/L sodium formate buffer, pH 3.8 and loaded onto a cation-exchange column, HiTrap SP. The column was washed with the same buffer and bound proteins were eluted with 1mol/L NaCl. The fractions containing recombinant  $\alpha$ -galactosidase were pooled and concentrated with PEG20 000. Subsequently, the biochemical properties of the enzyme were determined with typical methods. At last, the fresh human blood A and B erythrocytes were incubated with the purified  $\alpha$ -galactosidase at 26°C for 2 ~ 4 hours. Hemagglutinins were assayed by the standard method. After an elapsed fermentation times (EFT) of 18h, the fed-batch phase was initiated to increase the cell biomass. A cellular yield of nearly 200 g/liter wet cells was achieved when induction was initiated. 72h later, the  $\alpha$ -galactosidase activity against artificial substrate PNPG (PNP- $\alpha$ -galactopyranoside) achieved 36 000u per liter culture. The crude fermentation supernatant contained few impurities as detected by SDS-PAGE. The supernatant was purified by cation-exchange chromatography, the target  $\alpha$ -galactosidase was eluted with 40% 1mol/L NaCl and showed a 41kD band on SDS-PAGE. After concentration, the final recovery was about 41%. The Michaelis constant of the recombinant  $\alpha$ -galactosidase was determined as 0.275 mmol/L, which slightly lower than the nature enzyme and suggested a higher affinity with specific substrate. When human blood type B erythrocytes pretreated with 100u/mL recombinant  $\alpha$ -galactosidase reacted with blood type B antiserum, no hemagglutination occurred. This suggested that the B antigens had been removed by the enzyme successfully. These results demonstrated that the recombinant  $\alpha$ -galactosidase could be produced in large-scale and made it possible to explore the application of  $\alpha$ -galactosidase in more fields.

**Key words**  $\alpha$ -galactosidase, fermentation, purification, blood erythrocytes conversion