



Y1776158

浙江工业大学

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的科研成果。除文中已经加以标注引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得浙江工业大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

作者签名：

洪敏

日期：2010年5月26日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权浙江工业大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1、保密□，在_____年解密后适用本授权书。

2、不保密☒。

(请在以上相应方框内打“√”)

作者签名：

洪敏

日期：2010年5月26日

导师签名：

蔡永华

日期：2010年5月27日

STUDY ON ENZYMATIC PRODUCTION OF β -ALANINE

ABSTRACT

In this paper, The *panD* gene of *E. coli* BL21 (DE3)/pET28b(+)-*panD*, encoding the L-aspartate α -decarboxylase, was amplified from by PCR and cloned into the expression plasmid pET28c(+). The recombinant plasmid was then transformed into *E. coli* BL21(DE3) and screened on the resistant plate with 50 μ g/mL kanamycin. L-aspartate α -decarboxylase could be efficiently expressed in engineered strain *E. coli* BL21 (DE3) / pET28c(+)-*panD* by lactose induction. The value of enzymatic activity was 92.5 U/L. The PanD was correctly expressed by SDS-PAGE analysis. But it had a problem that the π' -subunit wasn't self-cleaved completely, the same with the strain of *E. coli* BL21 (DE3) / pET28b(+)-*panD*.

The optimal condition for producing PanD were as follows: incubation at 30 $^{\circ}$ C, 12 g/L lactose induction after culture for 3.5 h, incubation time was 20 h, and the optimum initial induction pH value of LB media was 5.5. Under these conditions, the recombination PanD

activity was 186 U/L, 101% higher than before.

The culture was treated by ultrasonic oscillation. The crude of PanD was purified by ammonium sulfate fractional precipitation and column chromatography of Ni affinity. The specific activity was 20.15 U/mg. The yield was 68.34% and the pureness of PanD was higher than 95%. Research of enzymatic properties showed that the optimal temperature and pH were 45 °C and 8.0. This PanD was stable between pH 5.0~8.0. Metal ion had no effect on activity of PanD. The higher temperature of water-bath could improve the self-cleavage rate. Water bath of 70 °C for 12 h, the activity of PanD increased by 360%.

E. coli BL21 (DE3)/pET28b(+)-panD was immobilized with calcium alginate, and the optimum embedding condition were as follows: 10% cells entrapped by 3% alginate, the optimal gelling agent and substrate were CaCl_2 and Asp-K. After the immobilized cells were utilized for 5 batches in continuous conversion, the immobilized particle was dissolve gradually.

KEY WORDS: engineered strain, fermentation, purification, cell immobilization, β -alanine

目 录

第一章 综 述	1
1.1 β -丙氨酸简介	1
1.2 丙酮酰基依赖型氨基酸脱羧酶	1
1.2.1 组氨酸脱羧酶简介	2
1.2.1.1 Prv-HisDCase 结构	3
1.2.1.2 Prv-HisDCase 酶学性质的研究	3
1.2.2 精氨酸脱羧酶简介	4
1.2.2.1 Prv-ArgDC 结构	4
1.2.2.2 Prv-ArgDC 酶学性质的研究	4
1.2.3 L-天冬氨酸 α -脱羧酶	5
1.2.3.1 PanD 结构	5
1.2.3.2 PanD 酶学性质的研究	6
1.3 细胞固定化	6
1.3.1 固定化材料应具备的条件	7
1.3.2 常见固定化方法	7
1.3.2.1 吸附法	7
1.3.2.2 包埋法	7
1.3.2.3 共价结合法	9
1.3.2.4 交联法	9
1.3.2.5 复合载体固定化	9
1.3.2.6 无载体固定化	10
1.3.3 固定化对微生物生理变化的影响	11
1.3.3.1 固定化对微生物生长速率的影响	11
1.3.3.2 固定化对微生物活性的影响	11
1.3.3.3 固定化细胞对有毒抑制物质的耐受性	11
1.4 选题背景和目的	12
参考文献	13
第二章 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET28c(+)- <i>panD</i> 工程菌株构建	16
2.1 前言	16
2.2 材料与方法	16
2.2.1 菌种与质粒	16
2.2.2 仪器与 DNA 分析软件	17
2.2.3 主要药品与试剂	17
2.2.3.1 菌株构建相关药品试剂	17
2.2.3.2 试剂	18
2.2.4 培养基	18
2.2.4.1 活化培养基	18
2.2.4.2 液体培养基	18
2.2.5 引物	18
2.3 实验方法	19

2.3.1 <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET28 c(+)- <i>panD</i> 菌株构建	19
2.3.1.1 菌株构建实验流程	19
2.3.2 pET28c(+) 质粒的克隆	20
2.3.2.1 <i>E. coli</i> DH5 α 感受态细胞的制备	20
2.3.2.2 pET28c(+) 质粒转化	20
2.3.3 SDS 碱裂解法制备质粒 pET28c(+) (中量制备)	21
2.3.3.1 SDS 碱裂解法制备质粒 DNA	21
2.3.3.2 聚乙二醇沉淀法纯化质粒 pET28c(+)	21
2.3.4 SDS 碱裂解法制备质粒 pET28b- <i>panD</i> (小量制备)	22
2.3.5 琼脂糖凝胶电泳	22
2.3.6 用 PCR 技术扩增 <i>panD</i> 基因	22
2.3.6.1 PCR 扩增体系	22
2.3.6.2 PCR 扩增条件	23
2.3.6.3 PCR 扩增产物的纯化	23
2.3.7 PCR 产物和 pET28c(+) 质粒的双酶切	23
2.3.7.1 酶切体系	23
2.3.7.2 切胶回收	24
2.3.8 连接与转化	24
2.3.8.1 连接体系	24
2.3.8.2 <i>E. coli</i> DH5 α 感受态细胞的制备及转化	25
2.3.9 质粒 pET28 c(+)- <i>panD</i> 鉴定	25
2.3.9.1 PCR 鉴定	25
2.3.9.2 碱基序列测定	26
2.3.10 <i>E. coli</i> BL21(DE3)/ pET28 c(+)- <i>panD</i> 菌株构建及酶活力鉴定	26
2.3.10.1 <i>E. coli</i> BL21(DE3)/ pET28 c(+)- <i>panD</i> 菌株构建	26
2.3.10.2 酶活力测定	26
2.3.10.3 重组菌株的 SDS-PAGE 检测	27
2.4 实验结果	27
2.4.1 重组表达质粒 pET28c(+)- <i>panD</i> 构建	27
2.4.2 重组质粒 pET28 c(+)- <i>panD</i> 鉴定	28
2.4.2.1 PCR 鉴定	28
2.4.2.2 碱基序列测定	29
2.4.3 重组菌株 <i>E. coli</i> BL21(DE3)/ pET28 c(+)- <i>panD</i> 酶活力检测	30
2.4.4 重组菌株的 SDS-PAGE 检测	31
2.5 实验小结	33
参考文献	33
第三章 菌株培养条件的初步研究	34
3.1 前言	34
3.2 材料与方法	34
3.2.1 菌株	34
3.2.2 主要仪器设备	34
3.2.3 主要药品与试剂	35
3.2.4 培养基	35
2.3 试验方法	35

3.3.1 菌种斜面活化	35
3.3.2 菌种接种种子培养基	35
3.3.3 摇瓶发酵条件的优化	36
3.3.3.1 诱导时间对重组菌株产酶活力的影响	36
3.3.3.2 不同乳糖浓度对重组菌株产酶活力的影响	36
3.3.3.3 诱导温度对重组菌株产酶活力的影响	36
3.3.3.4 不同菌龄对重组菌株产酶活力的影响	36
3.3.3.5 诱导初始 pH 值对重组菌株产酶活力的影响	37
3.3.4 酶活定义	37
3.4 结果与讨论	37
3.4.1 诱导时间对重组菌株产酶活力的影响	37
3.4.2 不同乳糖浓度对重组菌株产酶活力的影响	38
3.4.3 诱导温度对重组菌株产酶活力的影响	39
3.4.4 不同菌龄对重组菌株产酶活力的影响	40
3.4.5 诱导初始 pH 值对重组菌株产酶活力的影响	41
3.5 实验小结	42
参考文献	42
第四章 PanD 的分离纯化及酶学性质研究	43
4.1 前言	43
4.2 材料与方法	43
4.2.1 菌株	43
4.2.2 主要仪器设备	43
4.2.3 主要药品与试剂	44
4.2.3.1 主要药品	44
4.2.3.2 试剂	44
4.2.4 培养基	45
4.2.4.1 活化培养基	45
4.2.4.2 种子培养基	45
4.2.4.3 发酵培养基	45
4.2.4.5 PanD 酶活力测定	45
4.2 实验方法	45
4.2.1 菌株培养	46
4.2.1.1 菌种斜面活化	46
4.2.1.2 菌种接种种子培养基	46
4.2.1.3 摇瓶发酵	46
4.2.2 PanD 的纯化	46
4.2.2.1 菌悬液的制备	46
4.2.2.2 超声波破碎条件的选择	46
4.2.2.3 PanD 的硫酸铵盐析	47
4.2.2.4 脱盐	48
4.2.2.5 Ni-亲和层析纯化	48
4.2.2.6 脱盐	48
4.2.3 PanD 酶学性质的研究	48
4.2.3.1 酶的最适反应温度的选择	48

4.2.3.2 酶的最适反应 pH 的选择	49
4.2.3.3 酶的热稳定性	49
4.2.3.4 酶的 pH 耐受性	49
4.2.3.5 金属离子对酶活力的影响	49
4.2.4 温度对 PanD 自剪切的影响	50
4.2.5 SDS-PAGE 检测 PanD	50
4.3 结果与讨论	50
4.3.1 超声波破壁条件的研究	50
4.3.2 硫酸铵饱和度的选择	52
4.3.3 PanD 的分离纯化	53
4.3.3.1 硫酸铵分步盐析	53
4.3.3.2 脱盐	53
4.3.3.3 Ni-亲和层析	53
4.3.3.3 PanD 纯化	54
4.3.4.2 酶的最适反应 pH 的选择	56
4.3.4.3 酶的热稳定性	57
4.3.4.4 酶的 pH 耐受性	57
4.3.4.5 金属离子对酶活力的影响	58
4.3.5 温度对 PanD 自剪切的影响	59
4.4 实验小结	61
参考文献	62
第五章 <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET28b(+)- <i>panD</i> 细胞固定化条件的研究	63
5.1 前言	63
5.2 材料与方法	63
5.2.1 菌株	63
5.2.2 主要仪器设备	64
5.2.3 主要药品与试剂	64
5.2.4 培养基	64
5.2.4.1 活化培养基	64
5.2.4.2 种子培养基	64
5.2.4.3 发酵培养基	64
5.3 实验方法	65
5.3.1 菌株培养	65
5.3.1.1 菌种斜面活化	65
5.3.1.2 菌种接种子培养基	65
5.3.1.3 摇瓶发酵	65
5.3.1.4 菌体制备	65
5.3.2 固定化细胞性能的评价	65
5.3.2.1 固定化颗粒的机械强度考察	65
5.3.2.2 固定化颗粒包埋效果的考察	66
5.3.2.3 固定化颗粒粘附程度的考察	66
5.3.2.4 固定化操作难易程度的考察	66
5.3.3 细胞固定化	66
5.3.3.1 PVA 包埋法	66

5.3.3.2 海藻酸钠包埋法	67
5.3.4 固定化细胞转化	68
5.3.4.1 固定化细胞分批转化	68
5.3.4.2 固定化细胞连续转化	68
5.3.5 相关公式计算	68
5.4 实验结果	69
5.4.1 PVA 不同包埋法比较	69
5.4.2 海藻酸钠包埋法	70
5.4.2.1 不同成型剂的选择	71
5.4.2.2 海藻酸钠浓度的选择	72
5.4.2.3 菌体包埋量的选择	73
5.4.2.4 不同天冬氨酸盐的选择	74
5.4.3 固定化细胞连续转化	75
5.5 实验小结	76
参考文献	77
第六章 总结与展望	79
致 谢	81
附录 1. 高效液相色谱检测 β -丙氨酸	82
附录 2: 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量	84
附录 3 SDS-PAGE	86

第一章 综述

1.1 β -丙氨酸简介

β -丙氨酸 (β -alanine, β -Ala), 即 3-氨基丙酸 (3-aminopropanoic acid), 又称为 β -氨基丙酸, β -丝析氨酸, β -初油氨基酸。 β -丙氨酸的化学索引号(CAS)为 107-95-9, 分子式为 $C_3H_7NO_2$, 相对分子量为 89.094, 相对密度为 1.437。 β -丙氨酸分子结构见图 1-1。

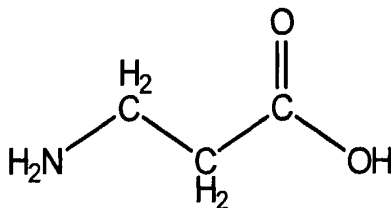


图 1-1 β -丙氨酸分子结构

Fig.1-1 β -alanine structure formula

β -丙氨酸纯品为白色棱状结晶或正交双锥体结晶, 无毒, 略带甜味, 加热分解温度为 197-198 $^{\circ}C$, 熔点(m.p.)为 200 (197-198) $^{\circ}C$ 。 β -丙氨酸溶于水, 微溶于甲醇和乙醇, 不溶于乙醚和丙酮。25 $^{\circ}C$ 水溶液中溶解度为 55.5 g, 等电点 pI 为 6.9。 β -丙氨酸晶体常温时稳定, 但在空气中易吸潮, 需干燥保存^[1-2]。

β -丙氨酸是自然界中唯一存在的 β -型氨基酸, 它是一种非蛋白氨基酸, 1972 年由 Ross 和 Monroe 在尿嘧啶的降解产物中发现。

1.2 丙酮酰基依赖型氨基酸脱羧酶

在活体细胞内, 将氨基酸转化为其他有用的物质, 氨基酸脱羧酶起到了很重

要的作用。5'-磷酸吡哆醛 (PLP) 是最常见的辅基。然而, 有些氨基酸脱羧酶不需要 PLP 作为辅基, 而是以丙酮酰基作为催化活性基团, 这些氨基酸脱羧酶被称为丙酮酰基依赖型氨基酸脱羧酶,见表 1.1^[3]。

几乎所有的丙酮酰基依赖型氨基酸脱羧酶都有 2 种不同大小的亚基 (α -亚基和 β -亚基), 它们是由相应的基因表达, 首先形成无活性的前体 π -亚基, 在特定的丝氨酸残基处自剪切加工, 形成 N-末端具有丙酮酰基的 α -亚基和 C-末端为 -OH 基团的 β -亚基。SDS-PAGE 电泳时, 由于 β -亚基分子量很小, 很难检测到, 尤其是 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的 β -亚基, β -亚基分子量仅为 2.8 kDa。

表 1.1 丙酮酰基依赖型氨基酸脱羧酶的代谢作用

Table 1.1 Metabolic roles of pyruvoyl-dependent amino decarboxylase

名称	催化反应	代谢作用
L-组氨酸脱羧酶	$L\text{-组氨酸} + H^+ = CO_2 + \text{组胺}$	组胺在细菌代谢中作用未知,在动物体内起第二信使的作用.
L-精氨酸脱羧酶	$L\text{-精氨酸} + H^+ = \text{精胺} + CO_2$	用于合成多胺, 在细胞增值和分化中起重要作用
L-天冬氨酸 α -脱羧酶	$L\text{-天冬氨酸} + H^+ = CO_2 + \beta\text{-丙氨酸}$	β -丙氨酸用于合成泛酸、辅酶 A、酰基转移蛋白、肌肽等.

1. 2. 1 L-组氨酸脱羧酶

L-组氨酸脱羧酶 (Histidine decarboxylases, EC.4.1.1.22, HisDCase, HDC) 能催化 L-组氨酸脱羧后得到组胺。革兰氏阴性菌及哺乳动物的HisDCase都需要 PLP作为辅基, 所有革兰氏阳性菌的HisDCase都是丙酮酰基依赖型酶。目前, 人们对 *Lactobacillus* 30a^[4-6], *Tetragenococcus halophilus*^[7], *Clostridium perfringens*^[8], *Lactobacillus buchneri*^[3], *Leuconostoc oenos* 9204^[9], *Tetragenococcus muriaticus*^[10] 等多种Prv-HisDCase进行了研究。其中, 研究最早且最多的菌株是 *Lactobacillus* 30a。

1.2.1.1 Prv-HisDCase 结构

最早在 *Lactobacillus* 30a发现丙酮酰基依赖型HisDCase (Prv-HisDCase)^[4-6], 在最适pH 4.8时, 以六聚体($\alpha\beta$)₆的形式存在, 在pH 7.0和低离子浓度时, ($\alpha\beta$)₆、($\alpha\beta$)₃可逆型相互转变。在低pH环境中, 会构想发生改变, 来稳定活性位点的一个 α -螺旋。X-射线分析, 两个($\alpha\beta$)₃结合不紧密, 接触面积很少。相对来说, 三聚体($\alpha\beta$)₃ 中的三个 $\alpha\beta$ 亚基对之间结合紧密, 可抵抗高温及其他有毒物质。还发现其它菌株具有Prv-HisDCase, 见表1-2。

表1-2 丙酮酰基依赖型组氨酸脱羧酶

Table 1-2 pyruvoyl-dependent HisDCase

菌株	亚基结构	Mr $\times 10^3$		
		Native	α	β
<i>Lactobacillus</i> 30a ^[4-6]	($\alpha\beta$) ₆	190	29.7	9
<i>C. perfringen</i> ^[8]	($\alpha\beta$) ₆	216	27	9
<i>L. buchneri</i> ^[3]	($\alpha\beta$) ₆	203	25	9
<i>L. oenos</i> 9204 ^[9]	($\alpha\beta$) ₆	205	25.38	8.84
<i>T. muritaticus</i> ^[10]	($\alpha\beta$) ₆	259	29	13
<i>Micrococcus</i> sp. ^[3]	($\alpha\beta$) ₃	100	29	8

1.2.1.2 Prv-HisDCase 酶学性质的研究

Prv-HisDCase 专一性以 L-组氨酸作为底物。Rescei P A 报道, pH 对 *Lactobacillus* 30a 的 Prv-HisDCase 影响比较大^[8], 在最适 pH 4.8 时, 酶与底物有明显的结合趋势, Km 值为 0.3 mM。在中性或碱性环境中, 酶活力比较低, 甚至无活力。pH 7.0 时的 Km 值为 100 mM。Konagaya Y.等^[10]报道 *Tetragenococcus muritaticus* 中的 Prv-HisDCase 的最适 pH 为 4.5~7.0。pH 4.8 时 Vmax 为 16.8 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, Km 值为 0.74 mmol。对温度不敏感, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min, 酶活力只损失 2%; 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min, 酶活力损失 35%; 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min 后无酶活力。

如NaBH₄、D-环丝氨酸、胍、苯胍等可与羰基反应得试剂均对丙酮酰基依赖型酶有抑制作用, 其中羟胺抑制作用最有效。

据报道咪唑、组胺等对Prv-HisDCase具有竞争性抑制作用^[6,10]。胍基、尿酸^[11]、对氯汞苯甲酸、KCN对其也有抑制作用。1.5 M KCl或NaCl溶液可抑制Prv-HisDCase 50%的酶活力^[8]。

1.2.2 精氨酸脱羧酶

精氨酸脱羧酶（Arginine Decarboxylase, EC.4.1.1.19, ArgDC）可催化L-精氨酸产生精胺，用于多胺合成，在细胞增值和分化中起重要作用。目前，人们对*Chlamydomonas reinhardtii*^[12]，*Methanococcus jannaschii*^[13-15]，*Thermococcus kodakaraensis*^[16]等菌株的丙酮酰基依赖型精氨酸脱羧酶（Prv-ArgDC）进行研究。

1.2.2.1 Prv-ArgDC 结构

Prv-ArgDC研究的相对比较迟，Graham D E等^[13]人于2002年在*Methanococcus jannaschii*菌株中首次发现。Prv-ArgDC以3或6个αβ亚基对形式存在，与Prv-HisDCase相似。具体亚基结构见表1-3。

表1-3 丙酮酰基依赖型精氨酸脱羧酶

Table1-3 pyruvoyl-dependent arginine decarboxylase

菌株	亚基结构	Mr×10 ³		
		Native	α	β
<i>C. pneumoniae</i> ^[12]	(αβ) ₃	88	16	9
<i>M. jannaschii</i> ^[13]	(αβ) ₃	56	12	7
<i>T. kodakaraensis</i> ^[16]	(αβ) ₆	99.4	12.6	4.5

1.2.2.2 Prv-ArgDC 酶学性质的研究

Prv-ArgDC 特异性催化精氨酸和刀豆氨酸（精氨酸类似物），生成精胺和γ-guanidinopropylamine。Giles T N 报道^[12]*C. pneumoniae* 中的 Prv-ArgDC 在 pH 3.4 时，酶活力最高，pH 1.5 以上时酶活快速增加。但是在中性及碱性条件下活性降低，与 Prv-HisDCase 相似。

M. jannaschii Prv-ArgDC 具有耐热性^[13]，121 ℃温浴 20 min 还有 50%活性。

而 *C. pneumoniae* Prv-ArgDC 在 50 °C 温浴相同的时间后仅有 48% 的酶活力, 100 °C 温浴后只有 13% 的酶活力。Erika V S 等报道 *M. jannaschii* Prv-ArgDC 的最适温度为 70 °C, 最适 pH 为 6.0。 *T. Kodakaraensis* 的 Prv-ArgDC 在 60 °C ~ 100 °C 才具有酶活力, 70 °C 的酶活力为 0.28 U/mg^[16]。

与其他丙酮酰基依赖性酶相同, 亲核试剂与羧基基团反应抑制效果显著, 2 mM O-甲基羟胺和硝基苄基胺可以降低 *C. pneumoniae* 的 Prv-ArgDC 酶活力分别为 69% 和 75%, 2 mM L-argininamide 可抑制 33% 的酶活力^[12]。5 mM L-argininamide 及精氨酸甲酯可完全抑制 *M. jannaschii* Prv-ArgDC 酶活力。

1.2.3 L-天冬氨酸 α -脱羧酶

L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (L-aspartate α -decarboxylase, EC4.1.1.11, AspDC, PanD), 又称 L-天冬氨酸 1-脱羧酶。该酶以 L-天冬氨酸作为底物, 脱去 α -羧基后产生 β -丙氨酸 (β -Alanine, β -Ala)。所有菌株的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶都是以丙酮酰基为催化活性基团, 尚未发现以 PLP 作为辅基的 PanD。目前人们对 *Escherichia coli*^[17-22], *Corynebacterium glutamicum*^[23], *Mycobacterium tuberculosis*^[24], *Helicobacter pylori*^[25] 等多种菌株的 PanD 酶进行了研究。

1.2.3.1 PanD 结构

PanD 是一种四聚体酶, Ramjee^[2]等提出大肠杆菌首先形成四个分子量为 13.8 kDa 的无活性酶原单体 π -亚基, 由 126 个氨基酸组成, 其中一个 π -亚基经过重排形成酯基, 另外三个 π -亚基 Gly₂₄-Ser₂₅ 位置进行自剪切, 形成 C-末端含有羟基的 β -亚基(2.8 kDa)和 N-末端含有丙酮酰基的 α -亚基 (11 kDa)。不同菌株 PanD 区别见表 1-4。

表1-4 丙酮酰基依赖型L-天冬氨酸 α -脱羧酶Table 1-4 pyruvoyl-dependent L-aspartate α -decarboxylase

菌株	亚基结构	Mr $\times 10^3$		
		Native	α	β
<i>E. coli</i> ^[17]	($\alpha\beta$) ₄	59	11	2.8
<i>C. glutamicum</i> ^[23]	($\alpha\beta$) ₄	57	11.5	2.7
<i>M. tuberculosis</i> ^[24]	($\alpha\beta$) ₄	64	13.2	2.7

1.2.3.2 PanD 酶学性质的研究

PanD 的最适温度和最适 pH 值随菌种而异。Williamson 等^[21]报道 *E. coli* PanD 的最适 pH 为 6.5~7.5 之间, pH 5.3 和 8.6 酶活力只有一半。最适温度为 55 °C, 26 °C 和 78 °C 酶活力减半。而 *C. glutamicum* 和 *M. tuberculosis* PanD 的最适温度是 37 °C^[23-24]。

Cronan^[15]深入研究发现 *E. coli* PanD 的最佳 pH 值是 7.5, 在 pH 6.8 和 8.0 溶液中的反应速率约为 pH 7.5 的 60%。Chopra 等^[24]发现 *M. tuberculosis* 中 PanD 的最佳 pH 值是 7.0。

除了一些亲核试剂外, β -羟基-DL-天冬氨酸, 磺基丙氨酸, 草酰乙酸, 琥珀酸, L-谷氨酸, D-丝氨酸等L-天门冬氨酸的结构类似物都是该酶的竞争性抑制剂, 而 L-天门冬氨酸的立体异构体 D-天门冬氨酸既不是底物也不是酶活力抑制剂。一些金属阳离子也抑制其酶活力, 如 10 mM CuCl₂ 可以抑制 88% 的酶活力, 200 mM KCl 可以抑制 63% 的酶活力^[26]。

1.3 细胞固定化

细胞固定化技术是指利用物理或化学手段将游离细胞定位于限定的空间区域并使其保持活性和可以反复使用的一种基础技术, 它是在固定化酶技术的基础上发展起来的。

1.3.1 固定化材料应具备的条件

理想的微生物固定化载体应具备以下条件：机械强度高，寿命长，价格低廉，性质稳定，具备一定的容量，不易被生物降解且固定化过程简单，常温下易于成形，固定化过程及固定化后对微生物无毒，生化及热力学稳定性好，基质通透性好，沉淀分离性好，具有惰性，不能干扰生物分子的功能^[27]。

1.3.2 常见固定化方法

目前经常采用的生物固定化方法主要有吸附法、包埋法、交联法和共价结合法，各种固定化方法和载体都各有特点。微生物细胞的固定化方法以包埋法和吸附法最为常用。

1.3.2.1 吸附法

吸附法是将微生物细胞附着于固体载体上，微生物细胞与载体之间不起化学反应，并且具有操作简单，固定化条件温和，细胞活性损失小，载体可以反复使用等优点，所以被广泛应用和深入研究。

常用的吸附载体有：木屑、焦炭、塑料、硅胶、煤渣、硅藻土、石英砂、纤维素、活性炭等。Hideki Y 及 Christov P 等人以多孔陶瓷为吸附载体对细胞进行固定化^[28-29]。陈文谋^[30]等人分别以多孔陶瓷和浮石为载体吸附法固定重组大肠杆菌(*Escherichia coli* J M 1092pL F3) 表达 β -葡聚糖酶，获得了良好的效果。

1.3.2.2 包埋法

包埋法是将微生物封闭在天然高分子多糖类或合成高分子凝胶的网络中，从而使微生物固定化。其特点是可以将固定化微生物制成各种形状(球状、块状、圆柱状、膜状、布状、管状等)，但包埋法制得的固定化微生物对传质有一定的影响。

根据包埋颗粒的形成，包埋法主要可分悬滴法和切块法。悬滴法是指利用注射或滴压装置，将包埋剂和细胞的混和液滴入交联剂中，形成小球。切块法是将一定量的包埋剂加热溶于水，加入一定量的菌体悬浮液，混匀，倒入培养皿中，

冷却、硬化处理、洗涤和切块, 备用。

1.3.2.2.1 常见包埋材料

常用的包埋固定化材料有聚乙烯醇(PVA)、海藻酸钠、卡拉胶、琼脂、明胶、聚乙烯乙二醇(PEG)、光硬化树脂等。

①固定载体中应用最广泛的是海藻酸钙, 易于成形、无毒、成本低廉, 操作简单。但机械强度差, 使用寿命短, 且对单价阳离子及 PO_4^{3-} 敏感^[31]。

②聚乙烯醇(PVA)是一种新型的微生物包埋固定化材料, 具有机械强度高、抗微生物分解性能好、对微生物无毒、化学稳定性好、价格低廉等优点, 是一种具有实用潜力的包埋材料, 近年来应用较为广泛。然而将此法应用于微生物固定化需要考虑两个方面的问题。1. PVA 粘度高, 操作麻烦, 且 PVA 包埋颗粒易于粘在一起, 发生附聚现象, 固定化颗粒呈团状, 增加传质阻力。另一方面, 若使用 PVA-硼酸包埋法固定化细胞, 饱和硼酸溶液酸性强, 约 pH4, 降低固定化细胞活性。目前, 除了 PVA-硼酸交联法固定化细胞外, 报道了一些新的方法, 如 PVA 冷冻法, 降低菌体的附聚现象, 但是低温成型过程中细胞活性降低^[32]。

③卡拉胶固定化细胞制成条状, 具有制备快, 表面光滑致密, 不容易发生菌体泄漏, 且酶活力损失少等优点, 但价格较贵, 不宜工业化生产^[33]。

④其他

其它的一些天然高分子化合物, 如琼脂, 明胶等, 虽强度得到改善, 但价格偏高。

将上述包埋材料总结于下表:

1-5 固定化载体的性能比较

Table 1-5 Comparison of properties for immobilized carriers

载体	海藻酸钠	PVA	明胶	琼脂	卡拉胶
强度	较好	好	较差	差	好
传质性能	较好	好	差	差	较差
耐生物分解性	较好	好	差	无	好
对生物毒性	无	适中	无	无	小
固定难易	易	易	易	易	较难
价格	较贵	便宜	较贵	便宜	贵

1.3.2.3 共价结合法

共价结合法是微生物细胞表面上的官能基团(如氨基、羧基、巯基、羟基和咪唑基等)和固相支持物表面的反应基团之间形成共价键连接,从而成为固定化细胞。该方法细胞与载体之间的连接键很牢固,细胞不易发生脱落,但反应条件激烈,操作复杂。

1.3.2.4 交联法

交联法是利用含有两个以上官能基团的试剂直接与微生物细胞表面的反应基团发生反应,形成共价键,使其彼此交联形成网状结构的固定化细胞。该方法细胞不易脱落,稳定性好,但对细胞活性影响较大,因此应用受到一定的限制。常用的交联剂有很多,主要有戊二醛、聚乙烯亚胺等^[34]。

1.3.2.5 复合载体固定化

单一的固定化材料都有其优缺点,因此越来越多的将多种固定化材料复合使用研究,以达到固定化材料的优化。

王建龙,钟娅铃等用海藻酸钠和 PVA 复合载体固定化进行了改进,但海藻酸钠不适于含 PO_4^{3-} 缓冲液的反应体系。陆健等人用家蚕丝素制成丝素溶液,加入大肠杆菌细胞混匀凝固后,再用戊二醛固交联,制成固定化大肠杆菌细胞的丝

素凝胶，用于转化延胡索酸。取得了良好的效果^[35]。朱新荣等以海藻酸钠-琼脂为复合载体，用包埋法对啤酒酵母细胞固定化^[36]。

陈功等^[31]在 PVA 材料中添加少量的阴离子交换树脂，在胶片深冻过程中，由于 PVA 和树脂的热膨胀系数不同，形成了一系列以树脂为中心的孔洞，于是树脂将酵母细胞牢牢的固定在树脂周围的空洞中，同时酵母细胞又有足够的空间增值，利于发酵。此固定化细胞方法具有增殖细胞，又不易脱落的优点，在实际应用中将具有很大的优越性。

周桂等^[28]首次用玉米芯颗粒吸附、海藻酸钠复合材料包埋固定化黑曲霉孢子，吸附载体玉米芯颗粒取自玉米棒中芯的柔软部位，以保证制作的玉米芯颗粒多孔、柔软、吸附性强、机械强度好等优点，为细胞的固定提供了良好的网架空间。

1.3.2.6 无载体固定化

某些微生物细胞具有自絮凝(Self - flocculating)现象，可以在不加任何固定化材料的情况下形成颗粒^[33]。利用这种细胞自絮凝形成的颗粒作为一种固定化细胞的方法，是固定化细胞技术中全新的概念，与各种载体固定化细胞技术相比，这种无载体固定化细胞技术具有非常突出的优点，主要体现在：

①细胞的固定化方法非常简单，一般在摇瓶培养一段时间段就可以自己形成絮凝颗粒，培养液澄清透明，不产生细胞固定化过程的附加成本将絮凝细胞颗粒可以在生物反应器中逐级扩大培养。

②自絮凝细胞颗粒内部结构呈松散型，传质阻力很小，而且其颗粒内部表面不断自我更新，颗粒整体活性好。

③不使用细胞生长和代谢产物生物合成所需营养物质以外的其它任何化学物质，细胞的生理和生态环境不受外来物质的干扰，对目标产物的顺利合成有利。

④在生物反应器中一定的生理、生态、物理、化学和流体力学条件下，小颗粒的絮凝和大颗粒的解离可以呈动态平衡，不存在载体固定化细胞的强度问题。

1.3.3 固定化对微生物生理变化的影响

1.3.3.1 固定化对微生物生长速率的影响

在固定化细胞系统的代谢参数中,微生物生长速率是研究最多的参数之一。对于固定化细胞生长速率的降低,最可能的解释是由于固定化细胞的传质限制引起的。Omar^[34]认为,固定化细胞在培养过程中,营养物和氧气会形成浓度梯度,在固定化颗粒内部,由于营养物质的耗尽及氧含量低,导致微生物会停止生长。另一方面,固定化载体可阻止颗粒外激烈的环境,保护菌体,促进微生物生长。例如,将 *Tolypocladium inflatum* 包埋于塑料载体中,可以使微生物免受高剪切力的作用^[35]。据文献报道,用于微生物固定化的高分子载体(如 κ -卡拉胶)可为酵母细胞提供保护作用,维持细胞内 pH 值稳定、防止酸化、使固定化微生物浓度高于悬浮生长值。

1.3.3.2 固定化对微生物活性的影响

由于酵母细胞在工业应用上的重要性,因此,大量的研究集中在固定化对酵母细胞代谢活性的影响上。许多研究结果表明固定化可以激活酵母细胞的次级代谢功能,如产酶、抗生素等。Angelova 等的研究报道表明,将 *Aspergillus niger* 细胞固定在海藻酸钙凝胶内,可以促进细胞内过氧化物歧化酶的合成,改变细胞分泌的果胶水解酶的种类^[37]。

1.3.3.3 固定化细胞对有毒抑制物质的耐受性

在固定化酵母发酵乙醇的过程中,固定化细胞对乙醇的耐受性得到了较多的研究。很多研究结果表明,固定化细胞对乙醇这一抑制性产物的抗性增加,并且认为这种变化是由于固定化改变了微生物细胞的渗透性。

固定化细胞系统,除应用于乙醇发酵外,应用于有毒污染物和难降解有机物的生物降解也具有明显的优越性。例如,利用固定化细胞进行酚和氯酚的生物降解,人们发现固定化载体,如聚胺酯泡沫、 κ -卡拉胶、壳聚糖可以对污染物产生可逆吸附。在纤维床固定化生化反应器中固定化微生物可以耐受更高浓度的工业

溶剂。其主要原因不是由于载体的保护作用,而是由于固定化细胞对有机溶剂长期适应的结果。

1.4 选题背景和目的

目前国内外的报道都显示 β -丙氨酸在医药方面具有巨大潜力,但纵观国内外有关 β -丙氨酸的生产,基本上还是以化学合成为主。化学合成工艺流程长,生产过程复杂;生产工艺需高温、高压,能耗大;原料中含有强酸强碱、液氮,对设备要求苛刻;生产过程中产生了大量的含腈“三废”,对人和环境危害非常严重。随着 β -丙氨酸衍生物的不断开发, β -丙氨酸的生产显得尤为重要,积极寻求绿色型的生产方法是具有十分明显的经济效益和社会效益的。

从 β -丙氨酸的代谢途径可见,用天门冬氨酸作底物,可以一步生产 β -丙氨酸。国外已有对 PanD 结构、形成机制、最适酶活力条件等相关资料的报道,并且对于酶的实验室规模的初步分离纯化研究也有报道,国内目前还是空白。

野生型菌株的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶原 π -亚基由 126 个氨基酸组成。本实验已构建工程菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 b(+)-*panD*,以 *E. coli* DH5 α 中 *pand* 基因的起始密码子开始至 pET28 b(+)质粒中 *Hind*III 酶切位点后的第一个终止密码子止,应该共编码 139 个氨基酸,包含 6 个 His 标签。但是由于在设计引物时出现差错,正相引物 *panD* P1: 5'-AACGGATCC $\square$ ATGATTCGCACGATGCTG-3' *Bam*HI 酶切位点后,起始密码子前多了个碱基 T (方框标记),导致开放读码框出现与预期不同的结果,在表达的 139 个氨基酸之前多表达了 34 个氨基酸,猜测这可能是菌株酶活力较低的主要原因。

质粒 pET28 c(+)在 *Bam*HI 酶切位点前比质粒 pET28 b(+)少一个碱基 G。本实验用质粒 pET28 c(+)代替 pET28 b(+),构建工程菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-*panD*,弥补引物中多出一个碱基的不足,可以正确表达 139 个氨基酸。优化培养条件及 PanD 的酶学性质的研究,提高酶活力。通过对细胞固定化提高细胞使用率,为酶法工业化生产提供参考。利用微生物酶来催化合成 β -丙氨酸,这在国内外还未见报道。研究这种绿色型的生产方法将会具有广阔的前景。

参考文献

- [1] 许关煜主编. 医药中间体手册(上册)[M]. 北京, 化学工业出版社. 2000
- [2] 金维高. 医药中间体生产实用技术手册[M]. 北京, 化学工业出版社. 2001
- [3] Paul D, Esmond E S. Pyruvate-dependent enzyme[J]. Annu. Rev. Biochem., 1990, 59:29-59
- [4] Vanderslice P, Copeland W C, Robertus J D. Cloning and nucleotide sequence of wild type and a mutant histidine decarboxylase from *Lactobacillus 30a* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1986, 261:15186-15191
- [5] Schelp E, Worley S, Monzingo, *et al.* pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus 30a* [J]. J. Mol. Biol., 2001, 306:727-732
- [6] Chang G W, Snell E E. Histidine decarboxylase(*Lactobacillus 30a*)[J]. Methods Enzymol., 1971, 17:663-667
- [7] Satomi M, Furushita M, Oikawa H. Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce[J]. Food Microbiol., 2008, 126:202-209
- [8] Rescei P A, Moore W M, Snell E E. Pyruvate-dependent histidine decarboxylase from *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus buchneri*[J]. Biol.Chem., 1983, 258:439-444
- [9] Coton E, Rollan G C, Lonvaud Funel A. Histidine decarboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene[J]. Appl. Microbiol., 1998, 84:143-151
- [10] Konagaya Y, Kimura B, Ishida M. Purification and properties of a histidine decarboxylase from *Tetragenococcus muritatus*, a halophilic lactic acid bacterium[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92:1136-1142
- [11] Yamagata S, Snell E E. Histidine decarboxylase from *Lactobacillus 30a*: reconstitution from separated subunits[J]. Biochemistry, 1979, 18(14):2964-2967
- [12] Giles T N, Graham D E. Characterization of an acid-dependent arginine decarboxylase enzyme from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Bacteriol., 2007, 189:7376-7383
- [13] Graham D E, Xu H, White R H. *Methanococcus jannaschii* uses a pyruvate-dependent

- arginine decarboxylase in polyamine biosynthesis[J]. J. Biol. Chem., 2002, 277:23500-23507
- [14] Tolbert W D, Graham D E, *et al.* Pyruvoyl-Dependent Arginine Decarboxylase from *Methanococcus jannaschii*:Crystal Structures of the Self-Cleaved and S53A Proenzyme Forms[J]. Structure, 2003, 11:285-294
- [15] Erika V S, Diane E M, Cynthia K. Structures of the N47A and E109Q mutant proteins of pyruvoyl-dependent arginine decarboxylase from *Methanococcus jannaschii*[J]. Biological Crystallography, 2008, 64:377-382
- [16] Wakao F, Nanako M, Tadayuki I, *et al.* Agmatine is essential for the cell growth of *Thermococcus kodakaraensis* [J]. FEMS Microbiol Lett., 2008, 287:113-120
- [17] Cronan J E. β -Alanine Synthesis in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 1980, 141(3):1291-1297
- [18] Albert A, Dhanaraj V, Genschel U, *et al.*. Crystal structure of L-aspartate α -decarboxylase at 2.2Å resolution provides evidence for an ester in protein self-processing[J]. Nat. Struct. Biol., 1998, 4:289-293
- [19] Ramjee M K, Genschel U, Abell C,*et al.* *Escherichia coli* L-aspartate alpha-decarboxylase: preprotein processing and observation of reaction intermediates by electrospray mass spectrometry[J]. Biochem. J., 1997, 323:661-669
- [20] Schmitzberger F, Kilkenny M L, Lobley C M. Structural constraints on protein self-processing in L-aspartate alpha-decarboxylase[J]. EMBO J., 2003, 22:6193-6204
- [21] Williamson J M, Brown G. M. Purification and properties of L-aspartate alpha-decarboxylase, an enzyme that catalyzes the formation of beta-alanine in *Escherichia coli*[J]. Biol. Chem., 1979, 254:8074-8082
- [22] Pantaleone D P, Fotheringham I G, Ton J L. Process and composition for preparing D-aspartic acid[P]. US:5834259, 1996-10-28
- [23] Nicole D, Alfred P, Jorn K. Expression of the *Corynebacterium glutamicum* *panD* gene encoding L-Aspartate α -decarboxylase leads to Pantothenate Over production in *Escherichia.coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65:1530-1539
- [24] Chopra S, Pai H, Ranganathan A. Expression, purification, and biochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* aspartate decarboxylase, PanD[J]. Protein Expr. Purif., 2002, 25(3):533-540
- [25] Kwon A R, Lee B I, Han B W, *et al.*Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of aspartate 1-decarboxylase from *Helicobacter pylori*[J]. Acta Crystallogr., 2002, 58:861-863

- [26] Williamson J M, L-Aspartate alpha-decarboxylase[J]. *Methods Enzymol.*, 1985, 113:589-595
- [27] 徐雪芹, 李小明, 杨麒. 固定化微生物技术及其在重金属废水处理中的应用[J]. *环境污染治理技术与设备*, 2006, 7(7):99-104
- [28] Hideki Y, Tagai S, Kentaro S, *et al.* Production of recombinant protein by baculovirus infected insect cells in immobilized culture using porous biomass support particles[J]. *Journal of Bio science and Bioengineering*, 2000, 9(1):12-17
- [29] Christov P, Spassov G. Effect of matrix on (S)-p-chlorodip henylmethanol production by immobilized *Debaryomyces marama*[J]. *Process Biochemistry*, 1999, 34:231-237
- [30] 陈文谋等. 多孔陶瓷和浮石载体固定化重组大肠杆菌表达 β -葡聚糖酶[J]. *厦门大学学报*, 2007, 46(1):77-81
- [31] 陈功等. PVA 膜固定化酵母发酵酒精的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(8):244-247
- [32] Zhuge J. *Mordern Ferment Microorganism Experimental Technology*[J]. Beijing:Chemical Industry Press, 2005, 223-251
- [33] 黄磊. 固定化诺卡氏菌批次连续转化生产 L(+)酒石酸[J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2007, 33(6):794-798
- [34] 宋正光. 固定化细胞技术在废水处理中的应用研究进展[J]. *山西建筑*, 2007, 33(28): 201-202
- [35] 陆健等. 家蚕丝素凝胶固定化细胞生产 L-天门冬氨酸的研究[J]. *科学通报*, 2005, 21(5): 541-544
- [36] 朱新荣等. 复合载体对啤酒酵母细胞的固定化效果[J]. *湖北农业科学*, 2007, 46(3): 450-452
- [37] Angelova M B, Pashova S B, Slokoska L S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus niger* cells[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 26:544~549

第二章 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28c(+)-*panD* 工程菌株构建

2.1 前言

自然界中分离的菌株, L-天冬氨酸 α -脱羧酶活性都很低, β -丙氨酸产量有限。因此, 本实验室通过扩增 *E. coli* DH5 α 的 *panD* 基因, 已构建高活力的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶基因工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28b(+)-*panD*。但由于正向引物的起始密码子前多加了个碱基 T, 导致开放读码框出现与预期不同的结果, 在表达的 139 个氨基酸之前多表达了 34 个氨基酸。质粒 pET28 c(+)在 *Hind*III 酶切位点前比质粒 pET28 b(+)少一个碱基 G。本实验是在引物不变的基础上, 质粒 pET28c 代替 pET28b, 从而正确表达 L-天冬氨酸 α -脱羧酶。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌种与质粒

菌种和质粒: *E. coli* BL21(DE3) 和 *E. coli* DH5 α 由浙江工业大学微生物实验室保存。pET28c(+) 由浙江工业大学朱廷恒老师赠送。*E. coli* BL21 (DE3)/pET28b(+)-*panD* 浙江工业大学微生物实验室保存。

pET28c(+)为 pET 系统的翻译载体, 大小为 5367 bp, 在多克隆位点处比 pET28b(+)少一个碱基, 它带有 T7lac 启动子、卡那霉素抗性筛选标记和便于目的蛋白检测和纯化的融合亲和标签 His Tag。

2.2.2 仪器与 DNA 分析软件

SW-CJ-1F 超净工作台	苏净集团安泰公司
TE612—L 电子天平	北京赛多利斯天平有限公司
HWY-212 大容量双层全温恒温培养摇床	上海智诚分析仪器制造有限公司
TGL 16M 离心机	湖南湘智离心机厂
W201B 型数显恒温水浴锅	上海申胜生物科技有限公司
PYX-DHS-50×65 隔水式电热恒温培养箱	上海市跃进医疗器械一厂
K640 PCR 扩增仪	杭州晶格科仪器有限公司
DY CZ—28C 型垂直电泳槽	北京市六一仪器厂
E844 水平电泳仪	美国 UVP 公司
Agilent1100 高效液相色谱仪	美国安捷伦公司
Gel Doc 凝胶成像系统	美国伯乐公司
DNA 分析软件为 DNAMAN。	

2.2.3 主要药品与试剂

2.2.3.1 菌株构建相关药品试剂

质粒抽提试剂盒	上海生工生物技术服务有限公司
PCR 扩增试剂盒	上海生工生物技术服务有限公司
PCR 产物回收试剂盒	上海生工生物技术服务有限公司
DNA 凝胶回收试剂盒	上海生工生物技术服务有限公司
T4 DNA 连接酶	上海生工生物技术服务有限公司
限制性内切酶 <i>Bam</i> H I	Takara 公司
限制性内切酶 <i>Hind</i> III	Takara 公司
核酸电泳染料 (GoldViewna TM)	北京博大泰克生物基因技术有限责任公司
DNA 分子量 Marker	Takara 公司
蛋白 Marker(2-212 kDa)	BioLabs 公司

卡那霉素

上海生工生物技术有限公司

乳糖

上海恒信化学试剂有限公司

2.2.3.2 试剂

0.05 g/L Kan: 称取0.1 g Kan粉末, 溶解于20 mL无菌水中, 0.45 μ m水膜过滤除菌。

其余溶液和缓冲液均参照《分子克隆实验指南》(第三版)^[1]配制。

2.2.4 培养基

2.2.4.1 活化培养基

LB 固体培养基: 蛋白胨 10 g/L; 酵母膏 5 g/L; NaCl 10 g/L; 琼脂 20 g/L; 用 NaOH 溶液调 pH 至 7.0, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

2.2.4.2 液体培养基

LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g/L; 酵母膏 5 g/L; NaCl 10 g/L; 用 NaOH 溶液调 pH 至 7.0, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

2.2.5 引物

正相引物 *panD* P1:

5'-AACGGATCCTATGATTCGCACGATGCTG-3' *Bam*HI;

反相引物 *panD* P2:

5'-CCAAAGCTTAGCAACCTGTACCGGAATC-3' *Hind*III

由高丽娟设计, PCR 扩增产物的大小为 397 bp, 上海生工生物技术有限公司合成。

2.3 实验方法

2.3.1 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-*panD* 菌株构建

2.3.1.1 菌株构建实验流程

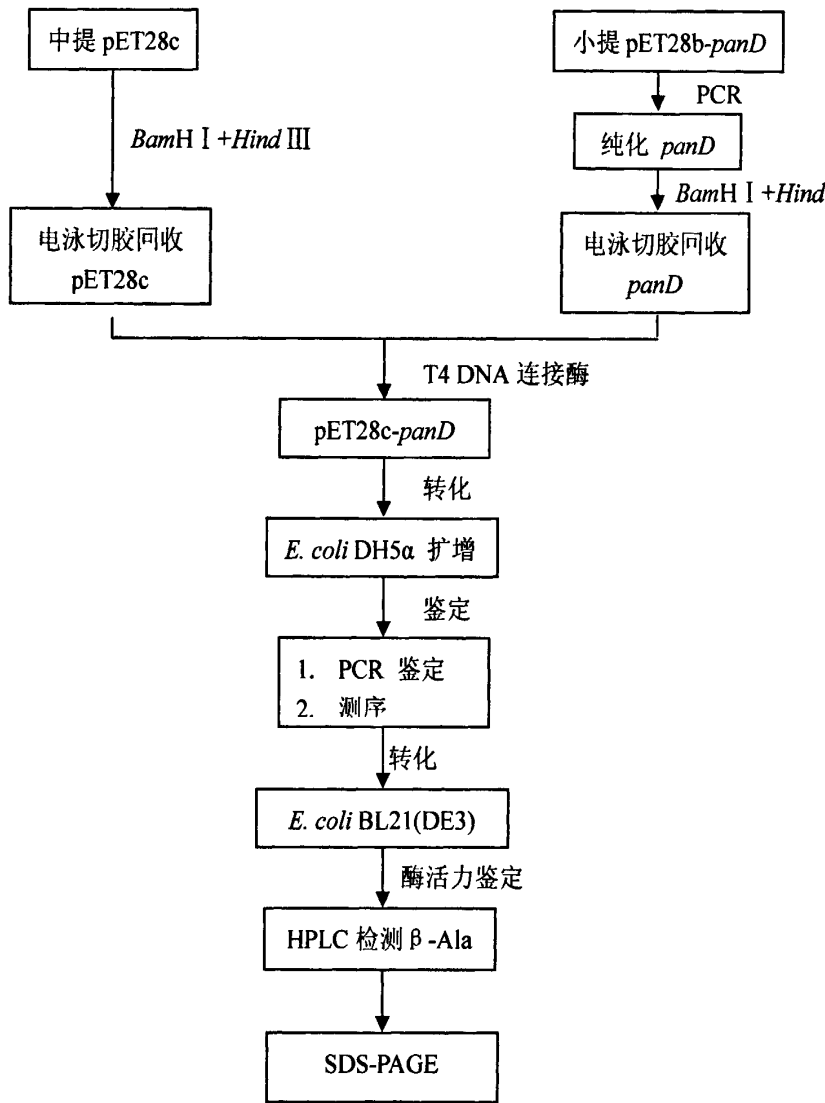


图 2-1 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-*panD* 菌株构建实验流程图

Fig.2-1 Experimental process of *E. coli* BL21(DE3)/pET28c(+)-*panD* construction

2.3.2 pET28c(+) 质粒的克隆

感受态细胞的制备及转化（氯化钙法）^[1]

2.3.2.1 *E. coli* DH5 α 感受态细胞的制备

- (1) 从新鲜的平板上挑取一个 *E. coli* DH5 α 单菌落，接种于 2 mL LB 培养基中，37 °C 摇床 200 r/min 培养过夜（12 h~14 h）。
- (2) 取过夜菌 100 μ L 接种于 2 mL LB 液体培养基中。
- (3) 37 °C 摇床培养 1.5 h，当 OD_{600} 达到 0.35~0.4 时（菌体浓度务必少于 10^8 个/mL），迅速冰浴 10 min，使菌液冷却至 0 °C。
- (4) 4 °C，5000 r/min 离心 5 min，弃去上清培养液（注意要尽量除尽！），收集菌体。
- (5) 加入 500 μ L 冰预冷的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 溶液，轻吹成悬液，冰浴 30 min。
- (6) 4 °C，5000 r/min 离心 5 min（转速不要太高），弃取上清。
- (7) 加 100 μ L 冰预冷的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 溶液，轻吹成悬液，4 °C 冰箱内放置 2~24 h，以 14~16 h 效果最好，转化效率最高。

2.3.2.2 pET28c(+) 质粒转化

- (1) 取 1 μ L pET28c(+) 质粒（其中的 DNA 要小于 50 ng），加入感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴 30 min。
- (2) 将离心管放入 42 °C 水浴中，热激 90 s，不要摇动管子。
- (3) 立即冰浴 1~2 min。
- (4) 加 400 μ L 新鲜 LB 液体培养基，37 °C 摇床温和培养 1~2 h（转速须低于 60 r/min）。
- (5) 取适量（100~200 μ L）涂布于 LB 固体培养基（含 50 μ g/mL Kan）平板上，37 °C 培养 12~16 h 可出现菌落，即 *E. coli* DH5 α /pET28c(+)。

2.3.3 SDS 碱裂解法制备质粒 pET28c(+) (中量制备)

2.3.3.1 SDS 碱裂解法制备质粒 DNA

- (1) 挑取 2.3.2.2 转化得到的单菌落, 接种于 2 mL 含 Kan 终浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 摇床培养过夜至对数中后期 (OD_{600} 约为 0.6); 按 1:50 的比例接种于 50 mL 含 Kan 终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 摇床培养至 OD_{600} 约为 0.4, 加氯霉素至终浓度 170 $\mu\text{g/mL}$, 继续培养 12~16 h。
- (2) 7000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 弃去上清, 尽可能除尽残液。
- (3) 加 1 mL 冰预冷的裂解液 I 和少许的溶菌酶, 剧烈震荡 1 min, 置于冰上 20 min。
- (4) 加 2 mL 新配置的裂解液 II, 快速颠倒数次混匀, 室温放置约 5 min。
- (5) 加 1.5 mL 冰预冷的裂解液 III, 轻轻颠倒数次充分混匀, 冰上放置至少 30 min。
- (6) 4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 r/min 离心 10 min, 将上清转移至另一只洁净的 10 mL 离心管中。
- (7) 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 轻轻颠倒数次充分混匀, 室温放置 1 h。7000 r/min 离心 10 min, 倒去上清; 沉淀用 1 mL 75%乙醇洗涤一次, 弃去上清, 将离心管倒置与纸巾上, 空气中干燥 15~20 min, 直至管壁上无残留液滴, 但应保持沉淀湿润。加 pH 8.0 TE Buffer 2 mL, 充分溶解 20~30 min。

2.3.3.2 聚乙二醇沉淀法纯化质粒 pET28c(+)

- (8) 加入 2 mL 冰预冷的 5 mol/L LiCl 溶液, 混匀, 冰浴 10 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 r/min 离心 10 min, 将上清转移至另一支洁净的离心管中。
- (9) 加等体积的异丙醇, 混匀, 室温放置至少 1 h; 室温 10000 r/min 离心 10 min。沉淀用 75%乙醇洗涤一次, 将离心管倒置与纸巾上, 自然干燥约 10~15 min, 沉淀用 pH 8.0 TE Buffer 0.5 mL 溶解, 将溶液转移至另一支洁净的 EP 管中。
- (10) 加 25 mg/mL RNase A 溶液 2 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h; 加入等体积的 PEG/MgCl₂ 溶液混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$, 放置过夜。
- (11) 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 回收沉淀的质粒 DNA; 沉淀用 1 mL

75%乙醇洗涤一次，以除去微量 PEG，加 pH 8.0 TE Buffer 400 μL 室温放置充分溶解 4 h。

(12) 加等体积酚/氯仿抽提 1~2 次，在用氯仿抽提 1 次。上清转移至另一支洁净的离心管，加 1/10 倍体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 和 2 倍体积的无水乙醇，混匀，-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h；4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000 r/min 离心 10 min，弃去上清，沉淀用 75%乙醇洗涤两次，将离心管倒置在纸巾上室温干燥 10~15 min 后，溶于 50 μL ddH₂O 中，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3.4 SDS 碱裂解法制备质粒 pET28b-*panD* (小量制备)

参照《分子克隆实验指南》(第三版)^[1]小量制备质粒 pET28b-*panD*。

2.3.5 琼脂糖凝胶电泳

用 1×TAE 电泳缓冲液配置 1% 琼脂糖凝胶，加热至琼脂糖完全溶解，冷却至约 60 $^{\circ}\text{C}$ 后，加入适量 DNA green 染料，摇匀，将溶解的琼脂糖倒入制胶模具中，厚度为 4~6 mm，插入梳子，室温下冷却凝固，将凝胶置入电泳槽中，加电泳缓冲液至液面覆盖凝胶约 2 mm。待充分凝固后小心垂直向上拔出梳子，以保证点样孔完好。用微量取液器吸取样品小心加入点样孔，同时点入 DNA Marker 作为对照，打开电泳仪，调节电压 80 V 进行电泳，完毕后将凝胶置于紫外透射检测仪上进行观察，根据分子量标准估算出样品的分子量与浓度。

2.3.6 用 PCR 技术扩增 *panD* 基因

2.3.6.1 PCR 扩增体系

在 PCR 管中依次加入如下物质，组成终体积为 50 μL 的反应系统。

表2-1 PCR扩增体系

Table 2-1 PCR amplification system

添加物	CK	样品
ddH ₂ O	38 μL	37 μL
10×PCR Buffer	5 μL	5 μL
2.5 mmol dNTP	4 μL	4 μL
10 μmol/L <i>panD</i> -P1	1 μL	1 μL
10 μmol/L <i>panD</i> -P2	1 μL	1 μL
5 U/μL Taq DNA polymerase	1 μL	1 μL
pET28 b(+)- <i>panD</i> 质粒DNA	0 μL	1 μL
Total Volume	50 μL	50 μL

2.3.6.2 PCR 扩增条件

将 PCR 管置于 PCR 扩增仪中，设定如下反应条件进行扩增：

94 ℃ 变性 3 min;
94 ℃, 1 min }
60 ℃, 1 min, } 30 个循环
72 ℃, 45 s, }
72 ℃ 延伸 6 min。

2.3.6.3 PCR 扩增产物的纯化

PCR 扩增产物用纯化试剂盒回收，方法参考 Takara 公司的纯化试剂盒说明书。

2.3.7 PCR 产物和 pET28c (+) 质粒的双酶切

2.3.7.1 酶切体系

用 *Bam*H I和*Hind* III双酶切PCR产物、pET28c(+). 根据Takara商品目录A-6

页，*Bam*H I和*Hind* III可用10×K buffer进行酶切反应，设计酶切反应体系见表2-2

表2-2 双酶切体系

Table 2-2 double endonucleases digesting system

添加物	PCR产物	pET28c(+)
ddH ₂ O	20 μL	20 μL
10×Buffer K	6 μL	6 μL
DNA	30 μL	30 μL
<i>Bam</i> H I	2 μL	2 μL
<i>Hind</i> III	2 μL	2 μL
Total Volume	60 μL	60 μL

准备2个EP管，分别依次加入上述物质，37 °C下作用4 h。

2.3.7.2 切胶回收

双酶切结束后，于1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收，切胶回收方法参考EZ-10 Spin 柱式DNA凝胶回收试剂盒说明书。

2.3.8 连接与转化

将步骤 2.3.6 及 2.3.7.2 酶切后得到的 PCR 产物双酶切后的基因片段与双酶切载体 pET28c(+)连接，构建重组质粒 pET28c(+)-*panD*。

2.3.8.1 连接体系

取 2 支 EP 管按下表分别依次加入，连接体系如下：

表2-3 pET28c(+)与panD连接体系

Table 2-3 The system of connecting pET28c(+) and panD

添加物	CK	样品
ddH ₂ O	6.8 μL	1.8 μL
10×Buffer	1.2 μL	1.2 μL
pET28c(+)	3 μL	3 μL
panD	5 μL	5 μL
T4 DNA连接酶	1 μL	1 μL
总体积	12 μL	12 μL

注：pET28c(+), panD为双酶切后的DNA片段。

16 ℃连接过夜。

2.3.8.2 E. coli DH5 α 感受态细胞的制备及转化

参照步骤2.3.2 制备E. coli DH5α感受态细胞及转化，然后涂布于含50 μg/mL的LB平板上。过夜培养，挑选出单菌落，鉴定。

2.3.9 质粒 pET28 c(+)-panD 鉴定

将步骤2.3.8 得到的E. coli DH5α/pET28 c(+)-panD转化子的质粒小量制备，分别从以下两个方面进行鉴定。

2.3.9.1 PCR 鉴定

分别以待测质粒与原7号菌株质粒pET28 c(+)-panD为模板，进行PCR扩增，1%琼脂糖凝胶带电泳检测。

表2-4 PCR扩增体系

Table 2-4 PCR amplification system

添加物	CK	1	2
ddH ₂ O	38 μL	37 μL	37 μL
10×PCR Buffer	5 μL	5 μL	5 μL
2.5 mmol dNTP	4 μL	4 μL	4 μL
10 μmol/L <i>panD</i> -P1	1 μL	1 μL	1 μL
10 μmol/L <i>panD</i> -P2	1 μL	1 μL	1 μL
5U/μ Taq DNA polymerase	1 μL	1 μL	1 μL
pET28 b(+)- <i>panD</i> 质粒DNA	0 μL	1 μL	0 μL
待测质粒DNA	0 μL	0 μL	1 μL
总体积	50 μL	50 μL	50 μL

2.3.9.2 碱基序列测定

挑转化子单菌落于2 mL含有50 μg/mL Kan的LB 液体培养基中，37 ℃、200 r/min振荡培养到16 h。送去上海生工测序。

2.3.10 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28 c(+)-*panD* 菌株构建及酶活力鉴定

2.3.10.1 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28 c(+)-*panD* 菌株构建

参照步骤2.3.2.1 制备*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞，转化上述鉴定后的pET28 c(+)-*panD*质粒，涂布于含50 μg/mL的LB平板上。过夜培养，挑选出单菌落，得到*E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-*panD*。

2.3.10.2 酶活力测定

将*E. coli* BL21(DE3)/ pET28 c(+)-*panD*划线于LB平板的单克隆菌株接入2mL含有50 μg/mL Kan的LB液体培养基中，37 ℃、200 r/min振荡培养到16 h。以2%的接种量接入30 mL含有相同Kan浓度的LB培养基中。37 ℃、200 r/min振荡培养

到 OD_{600} 值为0.6时, 加入乳糖至终浓度为8 g/L, 37 °C、200 r/min诱导培养24 h。将发酵液 4 °C, 5000 r/min离心5 min, 收集菌体, 无菌水洗涤两次。离心后加入0.1 mol/L的pH 7.0的天冬氨酸钠溶液8 mL, 混匀后, 37 °C、200 r/min下转化24 h。以*E. coli* BL21(DE3)/pET28 b(+)-*panD*诱导及未诱导作对照组实验重复三次。

HPLC检测酶活力。

酶活定义: 在 pH 7.0, 温度为37 °C的条件下, 1 h 转化生成产物 β -丙氨酸1 μ mol所需的酶量定义为一个酶活力单位(μ mol $\cdot$ h⁻¹), 简称为U。

2.3.10.3 重组菌株的 SDS-PAGE 检测

将两株菌株培养后SDS-PAGE电泳检测诱导表达的蛋白条带, 分析蛋白质大小。

表达蛋白电泳体系: Tricine-SDS-PAGE电泳体系

电泳样品的制备: 取上述发酵菌液1 mL, 5000 r/min离心5 min, 弃上清, 沉淀用无菌水清洗2次, 加入无菌水100 μ L悬浮沉淀, 加入等体积的2 $\times$ 载样液, 沸水浴3 min, 10000 r/min离心3 min, 取上清电泳。

2.4 实验结果

2.4.1 重组表达质粒 pET28c(+)-*panD* 构建

经 PCR 克隆得到的 *panD* 基因 (397 bp), 经 *Bam*H I 和 *Hind*III双酶切后与双酶切后的表达质粒 pET28c(+) 连接, 得到表达质粒 pET28c(+)-*panD*, 菌株构建见图 2-2。

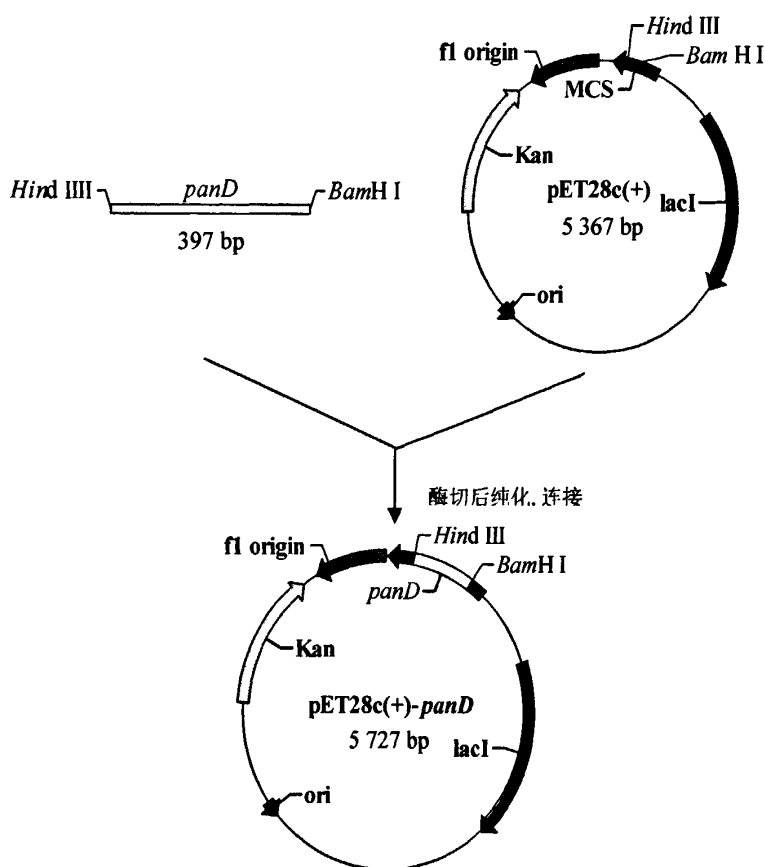


图 2-2 重组表达质粒 pET28c(+)-panD 构建过程
Fig.2-2 The construction of recombination plasmid pET28 c(+)-panD

2.4.2 重组质粒 pET28 c(+)-panD 鉴定

将重组菌株 *E. coli* DH5 α /pET28 c(+)-panD 中的质粒小量制备后进行 PCR 和测序两个方面进行鉴定。

2.4.2.1 PCR 鉴定

分别以新构建质粒与原 7 号菌株质粒 pET28 c(+)-panD 为模板，加入引物后 PCR 扩增，将两者扩增的 *panD* 基因片段进行大小比较，结果如图 2-3。

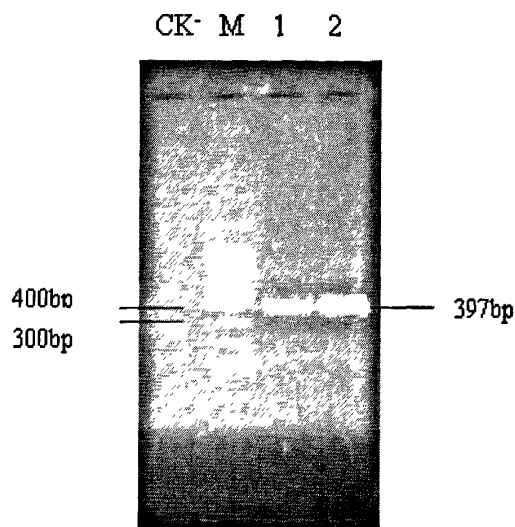


图 2-3 PCR 鉴定电泳图

Fig.2-3 PCR product identity by agarose gel electrophoresis

CK: 空白对照

M: Marker

1: 以pET28b(+)-*panD*为模板扩增的*panD*基因片段

2: 以待测质粒为模板扩增的DNA片段

由图2-3可知：待测质粒PCR扩增得到的DNA片段与以pET28b(+)-*panD*为模板扩增得到的*panD*基因片段大小相一致，均为397 bp。空白对照中未出现任何条带，因此可以初步断定待测质粒中可能含有*panD*基因片段。

2. 4. 2. 2 碱基序列测定

将新构建的重组质粒送去上海生工测序，结果如下：

AATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCT
CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCA
GCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGATCCTATGATTTCGC
ACGATGCTGCAGGGCAAACCTCCACCGCGTGAAAGTGACTCATGCGGACCT
GCACTATGAAGGTTCTTGCGCCATTGACCAGGATTTTCTTGACGCAGCCGG
TATTCTCGAAAACGAAGCCATTGATATCTGGAATGTCACCAACGGCAAGC
GTTTCTCCACTTATGCCATCGCGGCAGAACGCGGTTTCGAGAATTATTTCTG

TTAACGGTGCGGCGGCCACTGCGCCAGTGTGCGCGATATTGTCATCATC
GCCAGCTTCGTTACCATGCCAGATGAAGAAGCTCGCACCTGGCGACCCAA
CGTCGCCTATTTTGAAGGCGACAATGAAATGAAACGTACCGCGAAAGCGA
TTCCGGTACAGGTTGCTAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCAC
CACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGC
TGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAAC
GGGTCTTGAGGGGTTTTTGTCTGAAAGGAGGAAGTATATCCGGAT

注：划线碱基为 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切位点。

Ramjee^[2]等提出大肠杆菌首先形成四个分子量为 13.8 kDa 的无活性酶原单体 π -亚基，由 126 个氨基酸组成，其中一个 π -亚基经过重排形成酯基，另外三个 π -亚基 Gly₂₄-Ser₂₅ 键处自剪切，形成 C-末端含有羟基的 β -亚基(2.8 kDa)和 N-末端含有丙酮酰基的 α -亚基 (11 kDa)，氨基酸数目分别为 24 个和 102 个。

在设计引物中无终止密码子碱基序列，PCR 扩增产物连接到质粒 pET28c(+)的 *Hind*III 酶切位点后，利用质粒 pET28c(+)上的终止密码子终止转录。因此，在表达的 PanD 酶 π -亚基的氨基酸序列 C-末端连接了 13 个额外的氨基酸序列，包含 6 个组氨酸标签。

pET28c(+)-*panD* 质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)后，乳糖诱导后表达的蛋白质氨基酸序列如下：MIRTMLQGKLHRVKVTHADLHYEG/SCAIDQDFLDAAGILE NEAIDIWNVTNGKRFSTYAIAAERGSRIISVNGAAAHCASVGDIVIIASFVTMP DEEARTWRPNVAYFEGDNEMKRTAKAIPVQVAKLAAALEHHHHHHH，共 139 个氨基酸，为 *E. coli* DH5 α 的 PanD 酶 π -亚基的 126 个氨基酸加上 13 个额外的氨基酸序列（绿色），定义为 π' -亚基，分子量为 15.35 kDa。在 Gly₂₄-Ser₂₅ 位点处剪切后得到 β -亚基（蓝色）和 α' -亚基（红色+绿色），分子量分别为 2.9 kDa 和 12.4 kDa。PanD 酶四聚体的分子量应约为 61.4kDa。

高丽娟构建的菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28b(+)-*panD* 在 α -亚基的 N-末端多编码 34 个氨基酸，导致 π -亚基为 18.9 kDa。

2.4.3 重组菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28 c(+)-*panD* 酶活力检测

将新构建的菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-*panD* 与菌株 *E. coli*

BL21(DE3)/pET28b(+)-*panD* 在相同的培养条件下进行酶活力比较, 结果见表 2-4。

表 2-4 两株重组菌株酶活力比较

Fig.2-4 The contrast of the recombination strain

菌株	培养条件	酶活力/U·L
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/ pET28	非诱导	1.23
c(+)- <i>panD</i>	诱导	92.52
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/ pET28	非诱导	1.10
b(+)- <i>panD</i>	诱导	106.96

由以上结果可以发现, 未诱导菌株都具有少量酶活力, 说明有少量的本底表达或者酵母膏/蛋白胨中含有微量的乳糖诱导 PanD 表达。当加入 8g/L 的乳糖诱导后, 新构建的菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28 c(+)-*panD* 酶活力大幅度提高, 但是与 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28 b(+)-*panD* 相比, 活力并未如预期大量增加, 反而低于原菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28b(+)-*panD*。可能是由于 π -亚基的 N-末端多编码的 34 个氨基酸大多为亲水性氨基酸, 表达的 PanD 疏水性降低, 表达量高, 还需对培养条件等进一步优化, 提高酶活力。

2.4.4 重组菌株的 SDS-PAGE 检测

将两株菌株培养后 SDS-PAGE 电泳检测诱导表达的蛋白条带, 分析蛋白质是否正确表达, 结果见图 2-5。

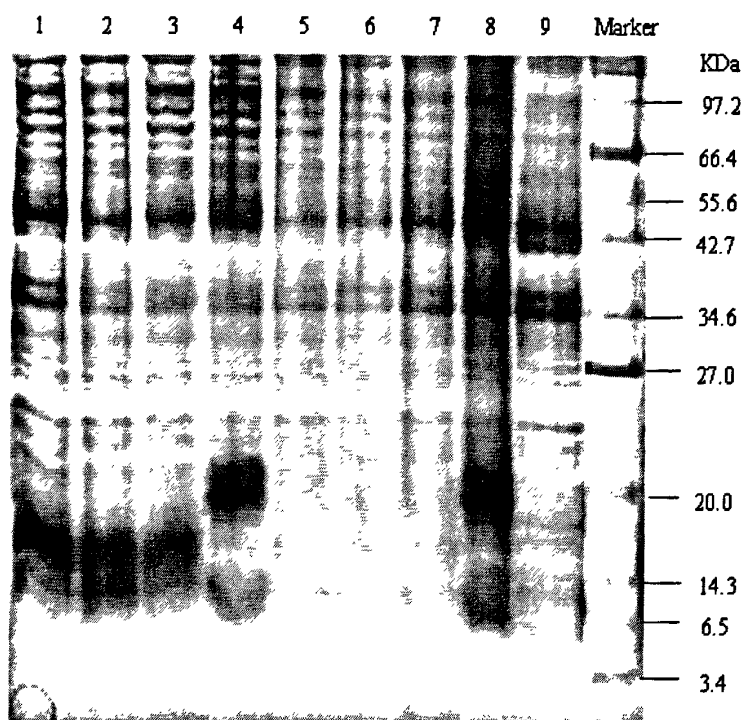


图 2-5 *panD* 基因表达的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.2-5 SDS-PAGE analysis of *panD* expression

泳道 1~3: *E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-*panD* 乳糖诱导

泳道 4、8: *E. coli* BL21(DE3)/pET28 b(+)-*panD* 乳糖诱导

泳道 5~7: *E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-*panD* 乳糖未诱导

泳道 9: *E. coli* BL21(DE3)/pET28 b(+)-*panD* 乳糖未诱导

由泳道 1~3 和泳道 5~7 对比可见在乳糖诱导后约 15~16 kDa 处有一条很深的条带, 与 PanD 变性后四聚体解离成单体的 π' -亚基大小一致, 约 15.35 kDa。其下方有一条较浅的条带约在 Marker 14.3 kDa 条带的下方, 与预测的 α' -亚基大小 12.4 kDa 相符。未诱导的菌株中, 这两个条带都很浅。 β -亚基分子量小, 约 2.93 kDa, 电泳检测不到。由以上分析可得, 新构建的菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-*panD* 为正确表达的菌株。

泳道 4、8 为 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 b(+)-*panD* 乳糖诱导后表达的蛋白条带, π -亚基明显大于新构建菌株的 π' -亚基。

从泳道 1~4、8 可以看出, 虽说 PanD 大量的表达, 但是还未完全自剪切, 多以无活性的酶原的形式存在。

2.3 实验小结

碱基序列分析发现重组质粒 pET28 c(+)-*panD* 正确地克隆了 *panD* 基因, 重组菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28 c(+)-*panD* 在乳糖诱导下合成的 PanD 具有 L-天冬氨酸 α -脱羧酶活性, 活力虽略低于菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28 b(+)-*panD*, 但与未诱导的菌株相比, 酶活力大幅度提高。通过 SDS-PAGE 电泳结果可知新构建的菌株能正确表达目标蛋白, 与预想的结果相一致。此菌株的构建试图改变传统的化学合成法生产 β -Ala, 通过生物法合成 β -Ala, 积极寻求绿色型的生产方法是具有十分明显的经济效益和社会效益的。

新构建的菌株虽能正确表达 L-天冬氨酸 α -脱羧酶, 但是酶活力还比较低, 还需要对培养条件等进一步优化, 以便得到更高的酶活力。且从 SDS-PAGE 电泳图中的 1~4、8 五个电泳条带可以看出, 无论是菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28 b(+)-*panD* 还是新构建的菌株, PanD 都未能得到完全的自剪切, 如何促进酶的自剪切还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京:科学出版社, 2002
- [2] Ramjee M K, Genschel U, Abell C, et al. *Escherichia coli* L-aspartate α -decarboxylase: preprotein processing and observation of reaction intermediates by electrospray mass spectrometry[J]. *Biochem*, 1997, 323:661-669

第三章 菌株培养条件的初步研究

3.1 前言

美国Novagen公司推出的pET系列的表达载体是一种高效的大肠杆菌表达系统。当目的基因被人为克隆至pET载体多克隆位点(T7lac强启动子下游) 中后,宿主菌在乳糖类似物IPTG(异丙基- β -D- 巯基半乳糖苷) 的诱导作用下高效表达目的重组蛋白。但是IPTG不适于大规模的工业化应用,一方面价格昂贵,另一方面它具有毒性,对宿主细胞具有伤害作用,而且是非代谢性乳糖类似物,不能被宿主菌利用,对人体也具有潜在的毒性。

乳糖是一种二糖,没有毒性,且价格低廉,目前有很多以乳糖替代 IPTG 作为诱导剂的研究^[1-2]。本章研究对影响菌株发酵产酶能力的几个主要因素进行单因子考察,确立了最适的产酶培养条件。

3.2 材料与方法

3.2.1 菌株

E. coli BL21 (DE3)/pET28b(+)-*panD*

3.2.2 主要仪器设备

SW-CJ-1F 超净工作台

苏净集团安泰公司

HWY-212 大容量双层全温恒温培养摇床

上海智诚分析仪器制造有限公司

TGL 16M 离心机

湖南湘智离心机厂

TE612—L 电子天平	北京赛多利斯天平有限公司
Agilent1100 高效液相色谱仪	美国安捷伦公司

3.2.3 主要药品与试剂

蛋白胨	生化试剂	上海化学试剂采购供应站中心化工厂
酵母浸膏	生化试剂	北京双旋微生物培养基制品厂
氯化钠	分析纯	浙江中星化工试剂有限公司
琼脂	化学试剂	福州泉州市泉港化工厂
氢氧化钠	分析纯	杭州萧山化学试剂厂
乳糖	分析纯	上海恒信化学试剂有限公司
L-天门冬氨酸	分析纯	浙江德清通宝生物工程有限公司

3.2.4 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L; 酵母膏 5 g/L; NaCl 10g/L; 水 1000mL; pH7.0。
固体培养基加 2%琼脂。121 °C 灭菌 20 min。

2.3 试验方法

3.3.1 菌种斜面活化

用接种环挑取一环 4 °C 保藏的工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-panD 划线于含有 50 µg/mL Kan 的 LB 平板, 37 °C 培养 24 h。

3.3.2 菌种接种种子培养基

用接种环挑取一环活化的工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-panD 接入 30 mL 含 50 µg/mL Kan 的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 16~18 h。

3.3.3 摇瓶发酵条件的优化

3.3.3.1 诱导时间对重组菌株产酶活力的影响

以 2.5% 的接种量将种子液接入 30 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 液体发酵培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 振荡培养 2.5 h (OD_{600} 约 0.6) 加入乳糖至终浓度 8 g/L 进行诱导培养, 分别于 5, 10, 15, 20, 25, 30 h 取出发酵液, 6000 r/min 离心 5 min, 菌体无菌水洗两次, 加入 pH 7.0 的 0.1 mol/L 天冬氨酸钠溶液 8 mL。37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 下转化 24 h。HPLC 法测定 β -Ala 含量, 分析诱导时间对重组菌株产酶活力的影响。

3.3.3.2 不同乳糖浓度对重组菌株产酶活力的影响

吸取 0.75 mL 种子液于 30 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 液体发酵培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 振荡培养 2.5 h (OD_{600} 约 0.6) 分别加入乳糖至终浓度 4 g/L, 8 g/L、12 g/L、16 g/L, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 培养, 20 h 后取出, 6000 r/min 离心 5 min, 菌体无菌水洗两次, 加入 pH 7.0 的 0.1 mol/L 天冬氨酸钠溶液 8 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下转化 24 h。HPLC 法测定 β -Ala 含量, 分析乳糖浓度对重组菌株产酶活力的影响。

3.3.3.3 诱导温度对重组菌株产酶活力的影响

以 2.5% 的接种量将种子培养液接入 30 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 液体发酵培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 2.5 h (OD_{600} 约 0.6) 后加入乳糖至终浓度 12 g/L, 分别于 25 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 35 $^{\circ}\text{C}$, 40 $^{\circ}\text{C}$ 温度下诱导培养 20 h, 6000 r/min 离心 5 min, 菌体无菌水洗两次, 加入 pH 7.0 的 0.1 mol/L 天冬氨酸钠溶液 8 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下转化 24 h。HPLC 法测定 β -Ala 含量, 分析乳糖诱导温度对重组菌株产酶活力的影响。

3.3.3.4 不同菌龄对重组菌株产酶活力的影响

以 2.5% 的接种量将种子液接入 30 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 液体发酵培养

基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h, 3.5 h, 4 h, 4.5 h 时, 加入乳糖至终浓度为 12 g/L, 35 °C 诱导 20 h, 6000 r/min 离心 5 min, 菌体无菌水洗两次, 加入 pH 7.0 的 0.1 mol/L 天冬氨酸钠溶液 8 mL, 37 °C、200 r/min 下转化 24 h。HPLC 法测定 β -Ala 含量, 分析不同菌龄诱导对重组菌株产酶活力的影响。

3.3.3.5 诱导初始 pH 值对重组菌株产酶活力的影响

用 1 mol/L HCl 和 NaOH 分别调 LB 培养基至 pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5。以 2.5% 的接种量将种子液接入 30 mL 含 50 μ g/mL Kan 的 pH7.0 的 LB 液体发酵培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 3.5 h 后离心, 转入上述不同 pH 的 30 mL 含 50 μ g/mL Ka 的 LB 液体发酵培养基中, 诱导 20 h, 6000 r/min 离心 5 min, 菌体无菌水洗两次, 加入 pH 7.0 的 0.1 mol/L 天冬氨酸钠溶液 8 mL, 37 °C、200 r/min 下转化 24 h。HPLC 法测定 β -Ala 含量, 分析诱导初始 pH 值对重组菌株产酶活力的影响。

3.3.4 酶活定义

在 pH 7.0, 温度为 37 °C 的条件下, 每升发酵液所得菌体每 1 h 转化生成产物 β -丙氨酸 1 μ mol 所需的酶量定义为一个酶活力单位(μ mol $\cdot$ L $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$), 简称为 U。

3.4 结果与讨论

3.4.1 诱导时间对重组菌株产酶活力的影响

工程菌培养 2.5 h (OD_{600} 约 0.6) 加入乳糖至终浓度 8 g/L, 37 °C, 200 r/min 诱导培养, 分别在 5、10、15、20、25、30 h 取样测酶活力。所得的工程菌产酶活力如图 3-1 所示。

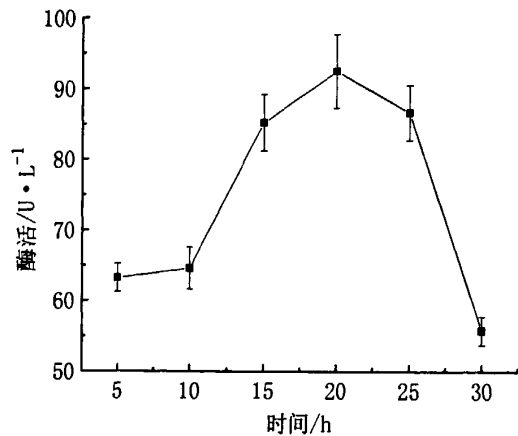


图 3-1 乳糖诱导时间不同与重组菌株产酶活力的关系

Fig.3-1 The effect of different induction time on decarboxylase activity produced by engineered strain

乳糖诱导时间不仅要考虑酶的表达量，还要考虑表达后自剪切情况，因此，诱导时间过短未能自剪切，不能形成具有酶活的 α -亚基，培养时间过久，细胞发生自溶，目标蛋白被降解。因此选择乳糖诱导时间为 20 h。

3.4.2 不同乳糖浓度对重组菌株产酶活力的影响

工程菌在培养 2.5 h (OD_{600} 约到 0.6)，加入乳糖至终浓度分别至 4 g/L、8 g/L、12 g/L、16 g/L，37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min 培养，20 h 后取样测酶活力。所得的工程菌产酶活力如图 3-2 所示。

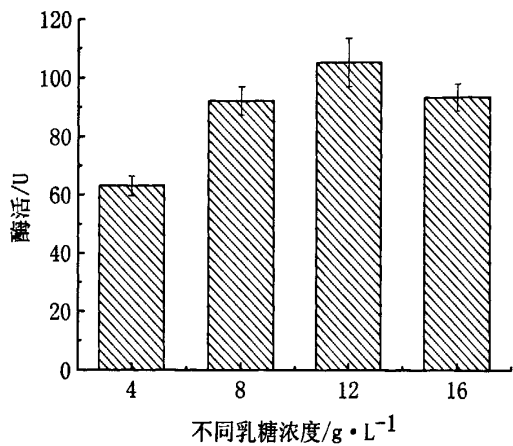


图 3-2 不同乳糖浓度对重组菌株产酶活力的影响

Fig.3-2 The effect of Lactose concentration on decarboxylase activity produced by engineered strain

随着乳糖浓度的增加，酶活上升。当乳糖浓度为 12 g/L 时，酶活力达到 105 U/L。16 g/L 的乳糖使酶活力有下降的趋势，说明多余的乳糖不利于酶活力提高。

3.4.3 诱导温度对重组菌株产酶活力的影响

将工程菌株 37 ℃ 培养 2.5 h 至 OD_{600} 约 0.6 时加入 12 g/L 乳糖后分别于 25 ℃，30 ℃，35 ℃，40 ℃ 温度下诱导 20 h，对工程菌的诱导温度进行研究，所得的工程菌产酶活力与诱导温度的关系如图 3-3 所示。在 25 ℃ 及 30 ℃ 时，酶活力较低，仅仅有 64 U/L 和 66 U/L，35 ℃ 时酶活性最高，40 ℃ 时温度过高，酶活性下降。

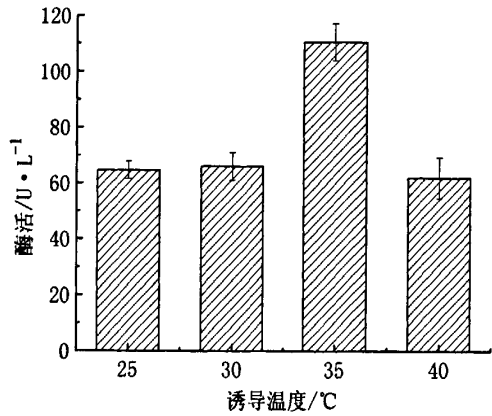


图 3-3 诱导温度对重组菌株产酶活力的影响

Fig.3-3 The effect of incubation temperature on decarboxylase activity produced by engineered strain

3.4.4 不同菌龄对重组菌株产酶活力的影响

工程菌 37℃，200 r/min 培养 1.5 h，2 h，2.5 h，3 h，3.5 h，4 h，4.5 h 时，加入乳糖至终浓度为 12 g/L，35℃ 诱导 20 h 取样测酶活力，所得的工程菌菌龄与产酶活性的关系如图 3-4 所示。当菌体生长至 3.5 h 时加入乳糖诱导，酶的活力最高，达到 136 U/L。加入的过早或过晚都不利于酶活。

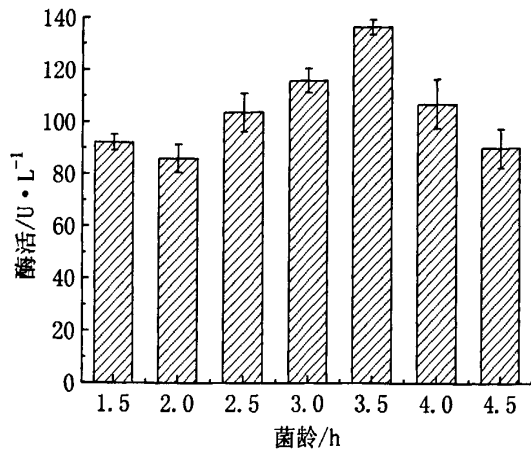


图 3-4 诱导菌龄对重组菌株产酶活力的影响

Fig.3-4 The effect of cell age on decarboxylase activity produced by engineered strain

3.4.5 诱导初始 pH 值对重组菌株产酶活力的影响

工程菌 37℃, 200 r/min 培养 3.5 h 后离心, 菌体水洗后加入到 30mL 用 1 mol/L HCl 和 NaOH 分别调至 pH 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的 LB 培养基中, 12 g/L 的乳糖诱导, 35℃ 诱导 20 h 时取样测酶活力。

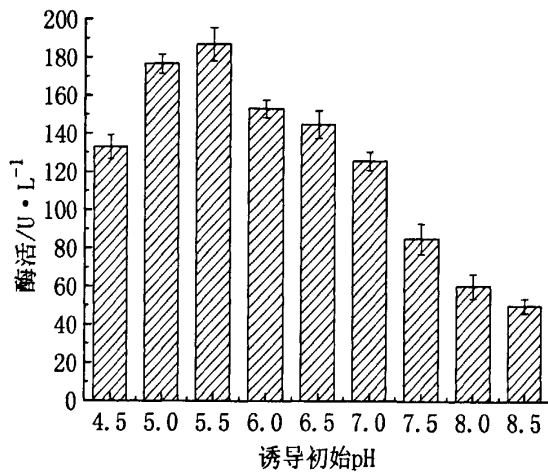


图 3-5 诱导初始 pH 值对重组菌株产酶活力的影响

Fig.3-4 The effect of initial pH value of induction on decarboxylase activity produced by engineered strain

结果见图 3-5, 将菌体培养至相同的菌龄后, 转入到不同 pH 的 LB 培养集中,

起始 pH 为 5.5 时, 酶活性最大, 为 186 U/L, pH 过酸或过碱都影响酶的活性。

3.5 实验小结

通过对工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28c(+)-*panD* 培养的乳糖诱导浓度、诱导时间、诱导温度、诱导菌龄和培养基诱导初始 pH 值等培养条件的优化, 得到最佳培养条件为: 乳糖诱导时间 20 h, 乳糖浓度 12 g/L, 诱导温度为 35℃, 诱导菌龄为 3.5 h, 诱导培养基初始 pH 5.5。通过对转化产物 β -丙氨酸的检测结果显示, 工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3) / pET28c(+)-*panD* 在优化条件下, 酶活力为 186 U/L。与未优化前相比, 酶活力提高 101 %。

虽然酶活力得到了很大提高, 但是若应用于工业化生产还远远不够。并且由于时间的限制, 还未对培养基进行优化, 在培养基优化这方面还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 吴一凡, 张双全等. 乳糖诱导 pET 载体表达重组蛋白的研究[J]. 南京师大学报, 2002, 25(1):89-93
- [2] 张毅, 屈贤铭等. 乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4):464-468

第四章 PanD 的分离纯化及酶学性质研究

4.1 前言

L-天冬氨酸 α -脱羧酶为胞内酶，是一种特殊的四聚体酶。Ramjee^[1]等提出大肠杆菌首先形成四个分子量为 13.8 kDa 的无活性酶原单体 π -亚基，其中一个 π -亚基经过重排形成酯基，另外三个 π -亚基在 Gly₂₄-Ser₂₅ 键处自剪切，形成 C-末端含有羟基的 β -亚基 (2.8 kDa) 和 N-末端含有丙酮酰基的 α -亚基 (11 kDa)。它的催化能力有赖于自剪切形成的丙酮酰基。无需 6-磷酸吡咯醛 (6-PLP) 为辅助因子。但是自剪切效率低，还存在大量无活性的酶原，这是酶活力较低的主要原因。本章分离纯化 PanD 酶，进行其酶学性质的研究，初探提高胞外 PanD 酶的自剪切效率的方法。

4.2 材料与方法

4.2.1 菌株

如第二章所述构建的基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28 c(+)-panD。

4.1.2 主要仪器设备

752 型紫外可见分光光度计	上海光谱仪器有限公司
W201B 型数显恒温水浴锅	上海申勝生物科技有限公司
Agilent1100 高效液相色谱仪	美国安捷伦公司
AKTA UPC-900 快速蛋白液相层析仪	美国 AKTA 公司

Gel Doc 凝胶成像系统	美国伯乐公司
低压层析仪	美国 BIO-RAD 公司
TGL 16M 离心机	湖南湘智离心机厂
细胞超声破碎仪	Sonics Vibra cell
蛋白电泳仪	北京六一仪器厂
HisTrap FF crude Ni-亲和柱	美国 GE 公司
Hiprep_26/10_Desalting 脱盐柱	美国 GE 公司

4.1.3 主要药品与试剂

4.1.3.1 主要药品

L-天门冬氨酸	分析纯	浙江德清通宝生物工程有限公司
蛋白胨	生化试剂	上海化学试剂采购供应站中心化工厂
酵母浸膏	生化试剂	北京双旋微生物培养基制品厂
NaCl	分析纯	浙江中星化工试剂有限公司
琼脂	生化试剂	福州泉州市泉港化工厂
NaOH	分析纯	杭州萧山化学试剂厂
硫酸卡那霉素	分析纯	博大泰克
乳糖	分析纯	上海恒信化学试剂有限公司
β -丙氨酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
碳酸氢钠	分析纯	上海虹光化工厂
无水乙酸钠	分析纯	温州润华化工实业公司
乙腈	色谱纯	Promptar company LTD.
咪唑	分析纯	美国 sigma 公司

4.1.3.2 试剂

- (1) 0.05 g/L Kan: 称取0.1 g Kan粉末, 溶解于20 mL无菌水中, 0.45 μ m水膜过滤。
- (2) 200 g/L 乳糖: 称取 200 g 乳糖, 加水定容至 1 L, 分装后 115 $^{\circ}$ C 灭菌 30 min。
- (3) 0.2 mol/L L-天门冬氨酸: 称取 26.62 g L-Asp, 加水定容至 1 L, 分装后 121 $^{\circ}$ C

灭菌 20 min。

(4) 缓冲液 Buffer A: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0。

(5) 缓冲液 Buffer B: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM 咪唑, pH 8.0。

(6) 缓冲液 BufferC: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑, pH 8.0。

4.1.4 培养基

4.1.4.1 活化培养基

LB 固体培养基: 蛋白胨 10 g/L; 酵母膏 5 g/L; NaCl 10 g/L; 琼脂 20 g/L; 用 NaOH 溶液调 pH 至 7.0, 121℃灭菌 20 min。

4.1.4.2 种子培养基

LB 液体种子培养基: 蛋白胨 10 g/L; 酵母膏 5 g/L; NaCl 10 g/L; 用 NaOH 溶液调 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

4.1.4.3 发酵培养基

LB 液体发酵培养基: 蛋白胨 10 g/L; 酵母膏 5 g/L; NaCl 10 g/L; 用 NaOH 溶液调 pH 至 5.5, 121 °C 灭菌 20 min。

4.1.5 PanD 酶活力测定

取 1 mL 酶稀释液 (约 500 μ g), 加入 1 mL 0.1 mol/L pH 7.0 的天冬氨酸钠溶液 37 °C 转化 1h, 取样检测产物 β -Ala 的含量。在此反应体系中, 以每小时生成的 1 μ mol 的 β -丙氨酸所需要的酶量作为一个活力单位 U。

4.2 实验方法

4.2.1 菌株培养

4.2.1.1 菌种斜面活化

用接种环挑取一环 4 °C 保藏的工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28 c(+)-*panD* 划线于含有 50 µg/mL Kan 的 LB 斜面, 37 °C 培养 24 h。

4.2.1.2 菌种接种种子培养基

用接种环挑取一环活化的工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28 c(+)-*panD* 接入 30 mL 含 50 µg/mL Kan 的 LB 液体种子培养基中, 37 °C, 200 r/min 振荡培养 16~18 h, 得种子液。

4.2.1.3 摇瓶发酵

吸取种子液, 以 2.5% 的接种量接种于 30 mL 含 50 µg/mL Kan 的 LB 发酵液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 振荡培养 3.5 h 后加入乳糖至终浓度为 12 g/L 诱导培养 20 h。

4.2.2 PanD 的纯化

4.2.2.1 菌悬液的制备

将发酵液 6000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 菌体无菌水洗涤两次。加入提取缓冲液 Buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 8.0), 漩涡振荡后混匀至菌体的终浓度为 5%。

4.2.2.2 超声波破碎条件的选择

取上述菌悬液于 100 mL 烧杯中, 冰水浴进行超声波破碎。设计一个 $L_{16}(4^5)$ 五因素四水平正交实验^[2], 分别从超声波振幅(%)、工作时间(s)、间隔时间(s)、总辐射时间(min)及 100mL 烧杯中菌悬液的体积(mL)五个因素正交试验对细胞破碎条件进行研究。各因素水平见表 4-1。

表 4-1 $L_{16}(4^5)$ 正交设计因素水平表

Table 4-1 Orthogonal design elements of $L_{16}(4^5)$

水平	A 超声波振幅	B 工作时间/s	C 间隔时间/s	D 总辐射时间	E 体积
	/%			/min	/mL
1	50	1	2	3	30
2	60	2	4	4	40
3	70	3	6	5	50
4	80	4	8	6	60

将超声破壁后的溶液 10000 r/min 离心 30 min，弃沉淀。检测粗酶液酶活力。

4.2.2.3 PanD 的硫酸铵盐析

4.2.2.3.1 硫酸铵饱和度的选择

- (1) 将硫酸铵固体研磨至粉末状。
- (2) 取上述粗酶 800 mL，均匀分成 8 份分别放入 200 mL 烧杯中，取 1 份作对照，其余 7 份置于磁力搅拌器上(使烧杯放置在冰水混合物中)边搅拌，边缓慢加入研磨后的硫酸铵粉末分别至饱和度 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，4 ℃冰箱中放置过夜。
- (3) 10000 r/min 离心 30 min，取上清液测酶活力。以未加入硫酸铵的粗酶液为 100%对照。确定最适的硫酸铵饱和度范围:x%→y%。

4.2.2.3.2 硫酸铵分级盐析

- (1) 按照 4.2.1.3.1 的方法向粗酶液中加入硫酸铵固体至饱和度 x%，4 ℃冰箱中放置 5 h，10000 r/min 离心 30 min，取上清。
- (2) 向上清中继续加入硫酸铵固体至饱和度 y%，4 ℃冰箱中放置过夜，10000 r/min 离心 30 min，弃上清，收集沉淀。将沉淀溶解于 5 倍沉淀体积的 Buffer A 缓冲液中，10000 r/min 离心 30 min，除去不溶的杂蛋白，收集上清。

4.2.2.4 脱盐

仪器采用 Bio-Rad 产的 FPLC, 选用的脱盐柱: Hiprep_26/10_Desalting, 柱体积 CV: 53.093 mL, 流速: 5 mL/min, 采用自动收集系统收集样品。

操作步骤:

- (1) 平衡: Buffer A 平衡 5 个柱体积。
- (2) 上样: 10 mL, 自动上样。
- (3) 洗脱: 洗脱 3 个柱体积。上样时开始收集, 每 5 mL 收集一管。

4.2.2.5 Ni-亲和层析纯化

收集脱盐后的洗脱峰, 加入 NaCl 至终浓度为 500 mmol/L, 以便在 Ni-亲和层析时减少非特异性吸附。仪器采用低压层析仪, 选用的 Ni-亲和柱为 GE 公司的 HisTrap FF crude 1mL 预装柱, 流速 1mL/min。采用手法收集洗脱峰。

操作步骤:

- (1) 平衡: 平衡缓冲液 Buffer B (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM 咪唑, pH 8.0) 平衡 10 个柱体积。
- (2) 上样: 20 mL, 分多次自动上样。
- (3) 平衡: 用平衡缓冲液平衡 20 个柱体积, 洗脱未吸附的杂蛋白。
- (4) 洗脱: 洗脱缓冲液 C (20 mM Tris-HCl, 500 M NaCl, 500 mM 咪唑, pH 8.0) 洗脱 10 个柱体积, 手动收集洗脱峰。

4.2.2.6 脱盐

将 Ni-亲和层析的洗脱液进行脱盐, 方法同 4.2.1.4。

4.2.3 PanD 酶学性质的研究

4.2.3.1 酶的最适反应温度的选择

取 1 mL PanD 酶稀释液, 加入 1 mL 0.1 mol/L pH 7.0 的天冬氨酸钠溶液至底物终浓度为 0.05 mol/L, 分别于 30℃, 37℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃ 水浴反应 1

h, 测定酶活力。以最高的酶活力为100%参比计算相对酶活力。

4.2.3.2 酶的最适反应 pH 的选择

配制 0.1 mol/L 不同 pH 梯度的缓冲液: pH 4.0, 5.0, 5.8 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液; pH 6.5, 7.0, 7.5 的 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液; pH 8.0, 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液。用上述缓冲液稀释 0.5 mol/L, pH 7.0 的天冬氨酸钠溶液至终浓度 0.1 mol/L, 得到不同 pH 的底物溶液。

分别取 1 mL PanD 酶稀释液, 加入 1 mL 上述不同 pH 的天冬氨酸钠底物溶液, 37 °C 下反应 1 h 后取样测 PanD 酶活力。以最高的酶活力为 100%参比计算相对酶活力。

4.2.3.3 酶的热稳定性

分别取 1 mL 酶稀释液于 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C 下水浴保温 1 h。加入 1 mL 以 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释的 0.1 mol 的天冬氨酸钠底物溶液, 45 °C 转化 1 h, 取样测酶活力。未温水浴酶稀释液的酶活力为 100%参比计算相对酶活力。

4.2.3.4 酶的 pH 耐受性

配制 0.1 mol/L 不同 pH 梯度缓冲液: pH 3.0, 4.0, 5.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液; pH 6.0, 7.0 的 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液; pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液; pH 9.0, 10.0 的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液。将 PanD 用上述不同 pH 的缓冲液稀释, 室温放置 1 h。转化测定酶活力。未加缓冲液保存的酶稀释液酶活力为 100%参比计算相对酶活力。

4.2.3.5 金属离子对酶活力的影响

配制 100 mmol/L 的不同金属离子盐溶液: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 , FeSO_4 。在反应体系中加入上述金属离子至终浓度为 10 mmol/L。45 °C 转化 1 h, 测定酶活力。以不加金属离子的酶

稀释液的酶活力为 100% 参比计算相对酶活力。

4.2.4 温度对 PanD 自剪切的影响

将 PanD 酶溶液分别置于 60 °C, 70 °C, 80 °C 三种不同温度的水浴锅中水浴 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 取样测酶活力。将 70 °C 水浴时间延长至 6 h 和 12 h, 分别取样测酶活力, 并对 70 °C 温水浴后的酶稀释液进行 SDS-PAGE 检测 PanD 自剪切情况。

4.2.5 SDS-PAGE 检测 PanD

蛋白电泳体系: Tricine-SDS-PAGE 电泳体系

电泳样品制备: 取酶稀释液 50 μ L, 加入等体积的 2 $\times$ 载样液, 沸水浴 5 min, 10000 r/min 离心 3 min, 取上清电泳。

4.3 结果与讨论

4.3.1 超声波破壁条件的研究

超声波破碎细胞是实验室常用的一种破碎方法, 超声波对细胞的破碎作用与液体中空穴的形成有关。不同细菌, 不同介质要采用不同的破碎参数, 以期在最短的时间达到最佳的破碎效果。为了不影响酶活性, 防止长时间超声波处理在液体中起空化作用引起的升温, 本实验采用冰水浴破碎结合短时多次的操作方法。所用 Sonics Vibra cell 超声波细胞粉碎机对破碎 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 c(+)-*panD* 菌株的最佳条件进行了研究。

表 4-2 $L_{16}(4^5)$ 正交实验结果

Fig.4-2 The result of orthogonal design of $L_{16}(4^5)$

编号	A 超声波 振幅/%	B 工作时 间/s	C 间隔时 间/s	D 总辐射 时间/min	E 体积 /mL	酶活力 /U·mL ⁻¹
1	1	1	1	1	1	2.82
2	1	2	2	2	2	3.69
3	1	3	3	3	3	2.72
4	1	4	4	4	4	3.48
5	2	1	2	3	4	4.50
6	2	2	1	4	3	6.30
7	2	3	4	1	2	4.07
8	2	4	3	2	1	4.24
9	3	1	3	4	2	4.60
10	3	2	4	3	1	4.80
11	3	3	1	2	4	3.59
12	3	4	2	1	3	3.89
13	4	1	4	2	3	3.88
14	4	2	3	1	4	3.63
15	4	3	2	4	1	3.27
16	4	4	1	3	2	2.77
X_1	3.1775	3.9500	3.8700	3.6025	3.7825	
X_2	4.7775	4.6050	3.8375	3.8500	3.7825	
X_3	4.2200	3.4125	3.7975	3.6975	4.1975	
X_4	3.4525	3.5950	4.0575	4.4125	3.8000	
R	1.6000	1.0100	0.2600	0.8100	0.4150	

由表 4-2 可知：影响超声波破碎效果的主次因素为：A>B>D>E>C。最佳工艺参数为 $A_2B_2D_4E_3C_4$ ，即振幅 60%，工作 2 s，间隔 4 s，总振幅时间 6 min，体积 50 mL 破碎效果最佳，酶活力最高。

超声波振幅反映了超声波能量的大小，振幅增大，有利于液体中空穴形成，

产生更多的空化泡,增强破碎效果,但同时释放的热量增加,溶液温度过高导致酶失活。因此可以选择合适的振幅,延长总辐射时间来提高破碎效果。采用短时多次超声辐射的工作方式有利于细胞破碎,适当延长间隔时间至 4 s 可以使空化效应产生的热量充分冷却又不影响破壁效率。延长每次超声波辐射时间、减少辐射次数的工作方式使破碎率明显降低。超声波通过空化效应破碎细胞的过程实际就是空化泡形成、振动、膨胀、压缩和崩溃闭合的过程,这一过程需要一段极为短暂的时间来完成,短时多次的工作方式能使超声波产生的空化泡有足够的时间和更多的机会完成膨胀和爆炸的过程,因此有利于细胞破碎。

4.3.2 硫酸铵饱和度的选择

以 100 mL,浓度为 2 mg/mL 粗酶液为出发酶液,以未加入硫酸铵盐析的粗酶液作对照,结果见表 4-3。在硫酸铵饱和度为 20%时,离心后上清液酶活力很低,沉淀中蛋白质含量也较少。当硫酸铵饱和度达到 30%时,上清液的酶活力降至粗酶液的 92%。随着硫酸铵加入量的增加沉淀逐渐增加,上清液的酶活力也随着急剧降低。50%硫酸铵饱和度的上清液中已完全检测不到酶活力。因此选取硫酸铵盐析的最佳饱和度范围为 30%~50%饱和度。

表 4-3 硫酸铵盐析结果

Table 4-3 Effect of salt out with different saturated ammonium sulfate

硫酸铵饱和度	上清液总酶活力 $\text{IU}\cdot 100\text{mL}^{-1}$	相对酶活力/%
CK	632	100
20	592	93.67
30	570	90.19
40	360	57.04
50	0	0
60	0	0
70	0	0
80	0	0

4.3.3 PanD 的分离纯化

由于 PanD 具有 his-标签, Ni-亲和层析后可得到高纯度的目标蛋白。选择硫酸铵盐析与 Ni-亲和层析两步纯化 PanD, 简化了操作步骤, 节约时间。

4.3.3.1 硫酸铵分步盐析

选择硫酸铵饱和度 30%~50%分步盐析, 出现大量沉淀。将沉淀溶解于 5 倍沉淀体积的 Buffer A 缓冲液中, 10000 r/min 离心 30 min, 除去不溶的杂质, 收集上清。

4.3.3.2 脱盐

选用 Hiprep_26/10_Desalting 脱盐柱, 采用自动收集系统收集样品, 上样时开始收集, 每 5 mL 收集一管。由图 4-2 可知, 合并 5、6、7 号管。

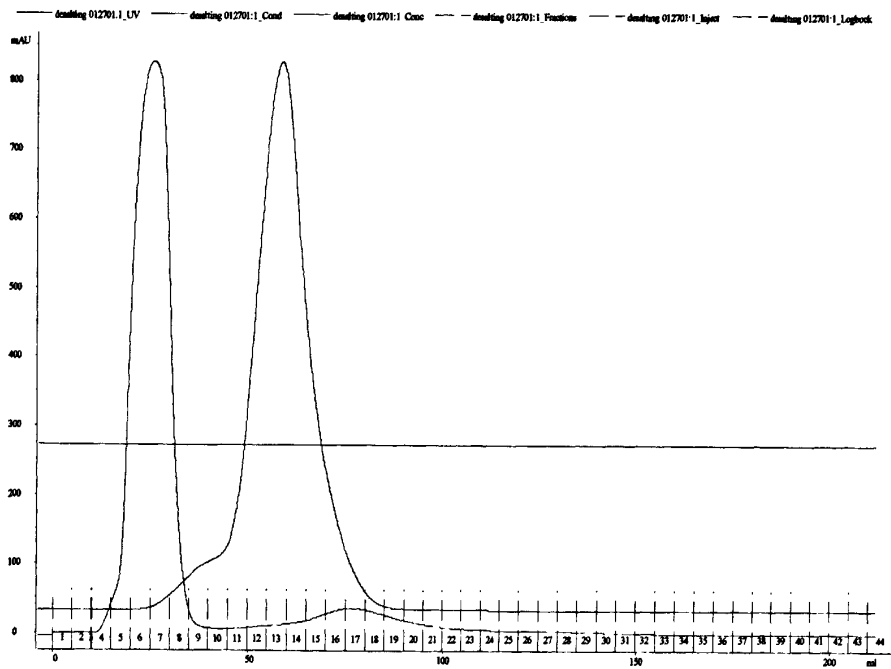


图 4-2 FPLC 脱盐图谱
Fig.4-2 FPLC desalting chromatography of PanD

4.3.3.3 Ni-亲和层析

仪器采用 BIO-RAD 低压层析仪, 样品多次少量上样后 Buffer B 平衡, 用含

有 0.5 M 咪唑浓度的 Buffer C 洗脱，收集洗脱液。

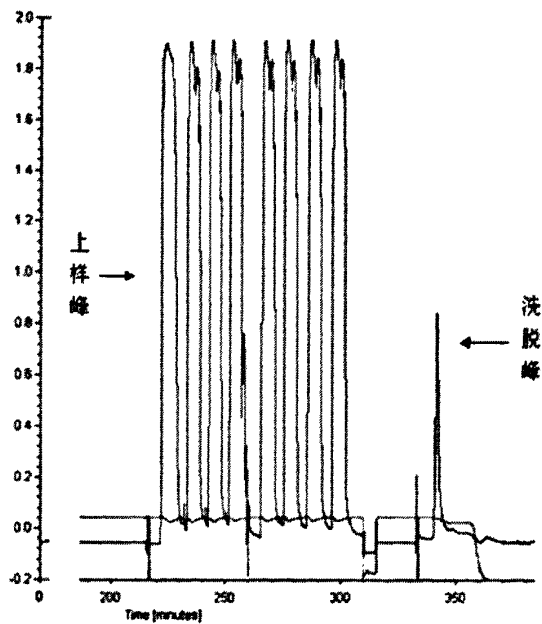


图 4-3 Ni-亲和层析图谱
Fig. 4-3 Ni-affinity chromatography of PanD

4.3.3.3 PanD 纯化

将粗酶液经过硫酸铵盐析与 Ni-亲和层析两步纯化后得到纯度较高的 PanD 溶液，SDS-PAGE 电泳分析纯化效果。结果见图 4-4。

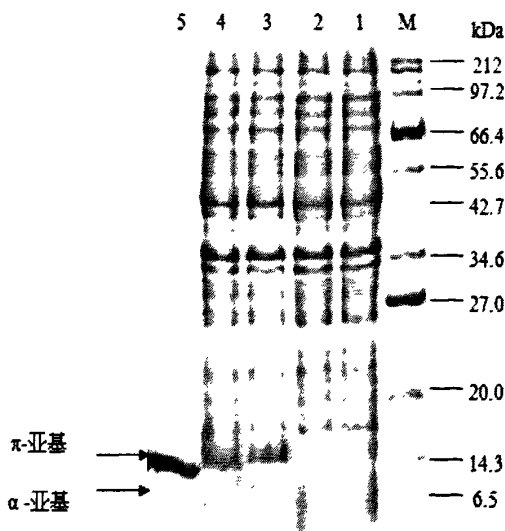


图 4-4 PanD 的 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig. 4-4 SDS-PAGE of PanD

M: 标准蛋白 Marker; 1-2: 未乳糖诱导的菌体破壁上清液; 3-4: 乳糖诱导后的菌体破壁上清液; 5: Ni-亲和层析纯化后洗脱液

Ni-亲和层析纯化后（泳道 5）有两条明显的条带，在 14.3 kDa 的上方有一颜色较深的条带，与预测的 π' -亚基大小一致，约 15.35 kDa，下方较浅的条带约在 Marker 14.3 kDa 条带的下方，与预测的 α' -亚基大小 12.4 kDa 相符，见方法 2.4.4。泳道 5 中还有一些浅浅的条带可能是 Ni-亲和层析时非特异性结合的杂蛋白。凝胶成像系统分析 PanD 酶纯度在 95%以上。

粗酶液经硫酸铵盐析及 Ni-亲和层析后的酶活力及纯化倍数、回收率等结果见表 4-4。粗酶液经两步纯化后比活力达到了 20.15 U/mg，纯化倍数为 6.58，酶活回收率为 68.34%。

表 4-4 PanD 纯化结果

Table 4-4 Isolation and purification of PanD

步骤	总蛋白含量 /mg	总酶活力/U	比酶活力 /U·mg ⁻¹	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	2020	6193	3.06	1.00	100
硫酸铵分步盐析	856	5249	7.43	2.42	84.75
Ni-亲和层析	210	4232	20.15	6.58	68.34

4.3.4 PanD 学性质的研究

4.3.4.1 酶的最适反应温度的选择

温度是影响酶活力的一个重要因素，当温度升高时，酶的活性会受到影响，甚至引起变性而丧失其催化活性。温度太低，酶的生物活性不能完全表现。将 PanD 分别置于 30℃，37℃，40℃，45℃，50℃，55℃ 水浴反应 1 h，以最高的酶活力为 100% 参比计算相对酶活力，见图 4-5。45℃ 为 PanD 的最适反应温度，在 40~50℃ 之间酶活性都比较高。低于 Williamson^[3] 等报道 *E. coli* PanD 最适的温度为 55℃。

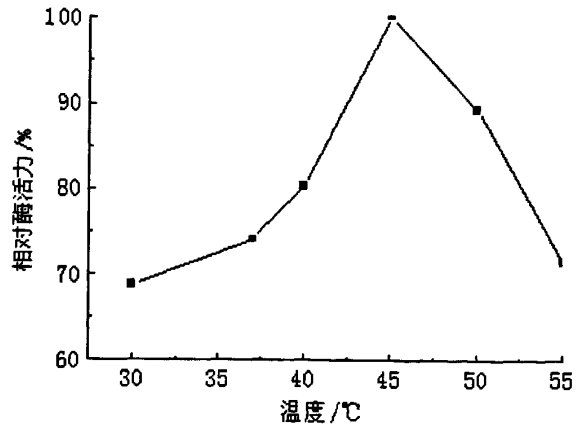


图 4-5 PanD 的最适温度

Fig.4-5 Optimum temperature of PanD

4.3.4.2 酶的最适反应 pH 的选择

酶的催化作用与反应液的 pH 有很大关系，主要由于在不同的 pH 条件下，酶分子和底物分子中基团的解离状态发生改变，从而影响酶分子的构象以及酶与底物的结合和催化能力。pH 过高或过低，都可引起酶的变性失活。取 1 mL PanD 稀释液，分别加入 1 mL 不同 pH 的天冬氨酸钠底物溶液至终浓度 0.05 mol/L，37°C 下反应 1 h 后测定 PanD 活性。结果见图 4-6。PanD 的最适 pH 为 8.0。与 Cronan^[4]报道的最适 pH 为 7.5 接近。当 pH 低于 7 时，酶活力下降明显。pH 4 时酶活力只有 pH 8.0 时酶活力的 20%。

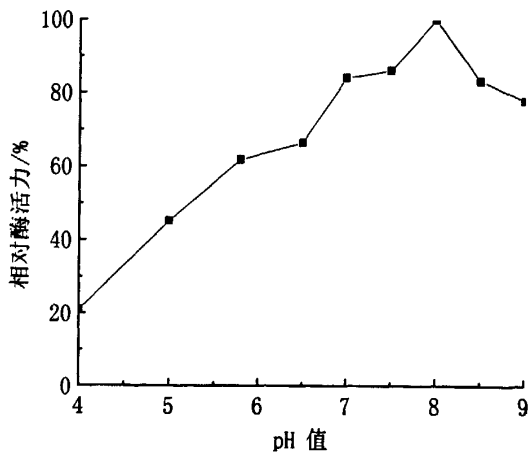


图 4-6 PanD 的最适 pH

Fig.4-6 Optimum pH of PanD

4.3.4.3 酶的热稳定性

将酶液至于 50 ℃, 60 ℃, 70 ℃, 80 ℃下水浴保温 1 h, 以未温浴的酶液酶活力做为 100%参比。结果见图 4-7, PanD 可耐受较高的温度, 且随着温度的升高, 并未出现预想的酶活降低, 而是随着温度的增加酶活力上升。80 ℃水浴 1 h 后, 酶活力上升了 84%, 但酶液出现少量的絮状沉淀, 可能是温度过高, 导致部分蛋白质部分变性。70 ℃水浴 1 h, 酶活力上升了 56%。综合分析, 可能是未剪切的 PanD 在高温水浴下发生自剪切, 无活性的酶原转化为有活性的酶, 因此酶活力上升。

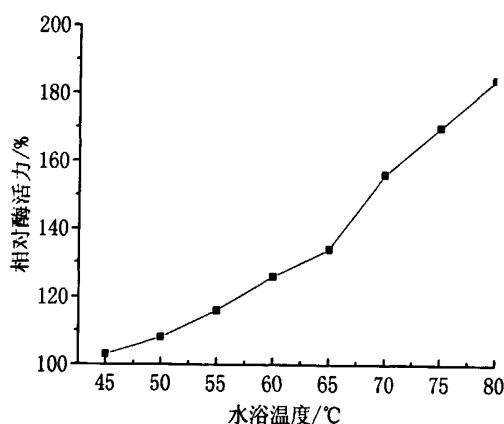


图 4-7 PanD 的热稳定性

Fig.4-7 Temperature stability of PanD

4.3.4.4 酶的 pH 耐受性

将酶液至于不同 pH 的缓冲液中保存 1 h, 检测 pH 对酶活力的影响。结果见图 4-8。

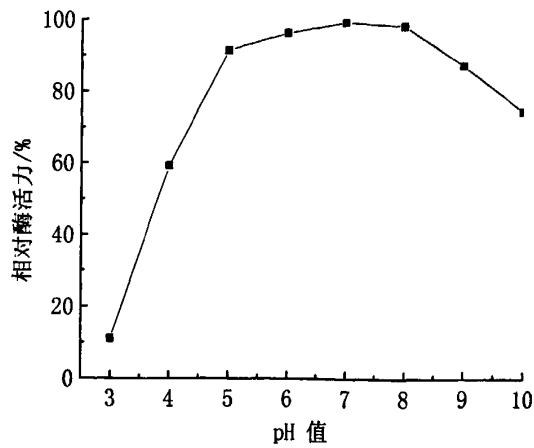


图 4-8 PanD 的 pH 耐受性

Fig.4-8 pH stability of PanD

PanD 在相当大的 pH 范围内 (pH5~8) 可以保持 90%以上的酶活力, 在 pH 9 的条件下保存 1 h, 酶活力还有 87%。当 pH<5 时, 酶活力下降明显, pH3 时, 酶活力仅有 11%。在 pH 10 的强碱条件下, 酶的稳定性较差。

4.3.4.5 金属离子对酶活力的影响

在酶的反应体系中加入金属离子至终浓度为 10 mmol/L, 研究金属离子对酶活力的影响。PanD 酶活性不依赖于 PLP, 是一种丙酮酰基酶, 可通过自剪切形成具有酶活性的丙酮酰基, 不需要以金属离子作为辅酶, 从表 4-5 也可以看出, 金属离子对 PanD 酶活力无显著影响。与 Williamson^[3]报道的不一致, 其报道 10 mM CuCl₂ 可以抑制 88%的酶活力, 200 mM KCl 可以抑制 63%的酶活力。

表 4-5 金属离子对 PanD 酶活力的影响

Table 4-5 Effect of metal ion on PanD

金属离子	相对酶活力/%
CK _{metal ion}	100
K ⁺ (KCl)	96
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	99
Cu ²⁺ (CuCl ₂ ·2H ₂ O)	100
Mg ²⁺ (MgCl)	94
Fe ²⁺ (FeSO ₄)	105
Zn ²⁺ (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	101
Mn ²⁺ (MnSO ₄ ·H ₂ O)	101
Co ²⁺ (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	104
Ag ⁺ (AgNO ₃)	100

4.3.5 温度对 PanD 自剪切的影响

Chopra S.等人报道结核分枝杆菌中的 PanD 酶最适切割条件是 37 ℃，温浴 48 h 后，酶原完全自剪切为有活性的酶。大肠杆菌中的 PanD 在 50 ℃剪切 48 h，可剪切完全。由 4.3.4.3 中酶的热稳定性研究可知：温度的提高，酶活力明显增加，因此选择 60 ℃, 70 ℃, 80℃三个温度对酶进行水浴，研究其自剪切情况。以未水浴的酶活力做 100%参比，结果见图 4-9。

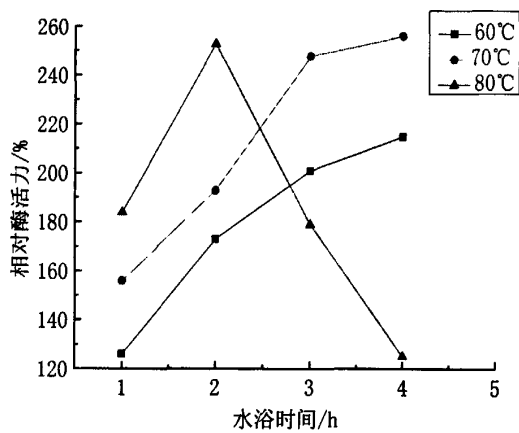


图 4-9 温度对 PanD 酶活力的影响

Fig.4-9 Effect of temperature on PanD

未温浴的 PanD 酶液的酶活力仅为 18.76 U/mg。80 ℃水浴 2 h，酶活力可以提高 153%，随着时间的增加，出现大量的白色沉淀，酶活力迅速下降，可能温度过高，导致蛋白质变性，当 80 ℃水浴 4h 时酶活力仅为 125%。60 ℃水浴 4 h 后，酶活力提高了 115%。

表 4-6 70 ℃温浴后的 PanD 酶活力

Table 4-6. The activity of PanD under 70 ℃ water-bath

温浴时间/h	0	2	3	4	6	12
酶活力/U·mg ⁻¹	18.76	36.21	46.52	48.02	54.97	86.41

70 ℃水浴 4 h 相对酶活力提高至 156%。继续延长水浴时间至 6 h 时酶活力提高至原来的 3 倍，酶活力达到 54.97 U/mg,12h 后酶活力为 86.41 U/mg，约提高 360%。对 70 ℃温浴后的酶液进行 SDS-PAGE 电泳，结果见图 4-10。

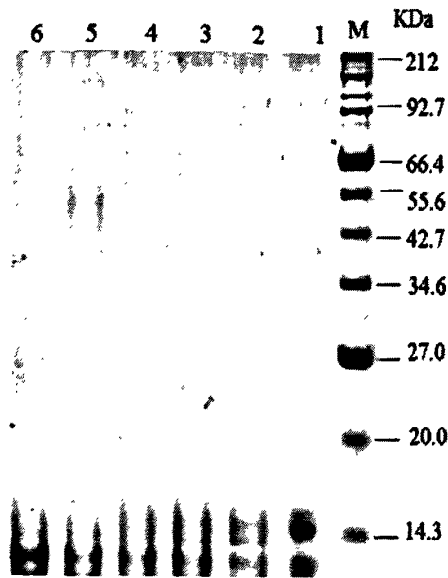


图 4-10 70 °C 温浴后的 PanD 酶 SDS-PAGE 图

Fig.4-10 SDS-PAGE of PanD under 70 °C water-bath

M: 标准蛋白 Marker; 1: 未温浴 PanD 酶; 2: 70 °C 温浴 2 h 的 PanD 酶;
3: 70 °C 温浴 3 h 的 PanD 酶; 4: 70 °C 温浴 4 h 的 PanD 酶; 5: 70 °C 温浴 6 h 的 PanD 酶;
6: 70 °C 温浴 12 h 的 PanD 酶

图 4-9 中泳道 1 为未温浴的 PanD 酶, 14.3 kDa 上方有明显的条带, 即为 π' -亚基, 分子量为 15.35 kDa。随着温浴时间的增加, 条带逐渐变浅, 而 α' -亚基条带相应的加深。表明 π' -亚基 70 °C 水浴后发生自剪切, 无活力的酶原转变为有活力的酶, 酶活力相应的提高, 与图 4-8 中的结果相符。70 °C 温浴 12 h 后仍有很浅的 π' -亚基条带, 说明 12 h 还未完全自剪切。在以后的研究中可延长水浴时间, 使 PanD 完全自剪切, 酶活力可进一步提高。

4.4 实验小结

分别从超声波振幅、工作时间、间隔时间、总辐射时间及 100 mL 烧杯中菌悬液的体积五个因素设计正交试验对细胞破碎条件进行研究, 最佳工艺参数为 $A_2B_2D_4E_3C_4$, 即每次振幅 60%, 工作 2 s, 间隔 4 s, 总振幅时间 6 min, 体积 50 mL 破碎效果最佳, 细胞破碎率达到 91%, 酶活力最高。将粗酶上清液硫酸铵盐析, 最佳饱和度范围为 30%~50%饱和度。粗酶液经过硫酸铵分级盐析及 Ni-亲

和层析两步纯化后, PanD 酶纯度在 95%以上, 比活力达到了 20.15 U/mg, 纯化倍数为 6.58, 酶活力回收率为 68.34%。

对纯化后的 PanD 酶溶液进行酶学性质的研究, 得到最适反应温度为 45℃, 最适 pH 为 8.0, 金属离子对酶活力其几乎无影响。PanD 较稳定, 在相当大的 pH 范围内 (pH 5~8) 保存 1 h, 仍可保持 90%以上的酶活。高温可提高 PanD 酶自剪切效率, 70℃水浴 6 h 时酶活力提高至原来的 3 倍, 酶活力达到 54.97 U/mg, 12 h 后酶活力为 86.41 U/mg, 约提高 360%, 酶的自剪切率明显提高。由于时间的原因, 未能对 PanD 四聚体进行非变性电泳, 研究四聚体的分子量。还可对完全剪切的 PanD 酶进行动力学研究。

参考文献

- [1] Ramjee M K, Genschel U, Abell C, *et al.* Escherichia coli L-aspartate α -decarboxylase: preprotein processing and observation of reaction intermediates by electrospray mass spectrometry[J]. Biochem., 1997, 323:661-669
- [2] 张健. α -乙酰乳酸脱羧酶的粗酶提取优化研究[J]. 现代食品科技, 2005, 20(2):40-42
- [3] Williamson J M. L-Aspartate alpha-decarboxylase[J]. Methods Enzymol., 1985, 113:589-595
- [4] Cronan J.E., β -alanine synthesis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1980, 141(3):1291-1297

第五章 *E. coli* BL21 (DE3) /pET28b (+)-*panD* 细胞固定化条件的研究

5.1 前言

细胞固定化技术是指利用物理或化学方法,将游离的微生物细胞限定于某一空间区域,并使其保持活性,从而可以反复利用的一项技术^[1],可分成吸附法、共价结合法、交联法、包埋法四大类。包埋法是将生物催化剂用物理或化学的手段包埋在各种载体中以实现固定化的方法^[2],是近年来迅速发展的一种新兴细胞固定化技术,操作简单、对细胞活性影响较小等优点,是目前细胞固定化研究和应用最广泛的方法^[3-5]。由于新构建的菌株*E. coli* BL21(DE3)/pET28c(+)-*panD*培养条件优化后酶活力仍低于实验室保存的菌株*E. coli* BL21(DE3)/pET28b(+)-*panD*,因此本章只对实验室保存的菌株*E. coli* BL21(DE3)/pET28 b(+)-*panD*进行细胞固定化的研究,分别采用聚乙烯醇(PVA)和海藻酸钠两种包埋材料,通过对操作的难易程度、凝胶颗粒的机械强度、底物摩尔转化率等进行研究以选择合适的包埋方法。

5.2 材料与方法

5.2.1 菌株

实验室保存的基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28 b(+)-*panD*。

5.1.2 主要仪器设备

W201B 型数显恒温水浴锅	上海申勝生物科技有限公司
TGL 16M 离心机	湖南湘智离心机厂
SW-CJ-1F 超净工作台	苏净集团安泰公司
TE 612—L 电子天平	北京赛多利斯天平有限公司
Agilent 1100 高效液相色谱仪	美国安捷伦公司

5.2.3 主要药品与试剂

L-天门冬氨酸	分析纯	浙江德清通宝生物工程有限公司
乳糖	分析纯	上海恒信化学试剂有限公司
海藻酸钠	化学纯	国药集团化学试剂有限公司
PVA (平均聚合度 1750±50)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
无水氯化钙	分析纯	天津申泰化学试剂有限公司
硼酸	分析纯	天津天大化工实验厂

5.2.4 培养基

5.2.4.1 活化培养基

LB 固体培养基: 蛋白胨 10 g/L; 酵母膏 5 g/L; NaCl 10 g/L; 琼脂 20 g/L; 用 NaOH 溶液调 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

5.2.4.2 种子培养基

LB 液体种子培养基: 蛋白胨 10 g/L; 酵母膏 5 g/L; NaCl 10 g/L; 用 NaOH 溶液调 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

5.2.4.3 发酵培养基

蔗糖 40 g/L; 玉米浆 50 g/L; 蛋白胨 10 g/L; 酵母膏 5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; NaCl 10 g/L; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 4g/L; 用 NaOH 溶液调

pH 至 6.0, 121 °C 灭菌 20 min。

5.3 实验方法

5.3.1 菌株培养

5.3.1.1 菌种斜面活化

用接种环挑取一环 4°C 保藏的工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28 b(+)-*panD* 划线于含有 50 µg/mL Kan 的 LB 斜面, 37 °C 培养 24 h。

5.3.1.2 菌种接种子培养基

用接种环挑取一环活化的工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28 c(+)-*panD* 接入 30 mL 含 50 µg/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 振荡培养 16~18 h, 得种子液。

5.3.1.3 摇瓶发酵

吸取种子液 0.75 mL 接种于 30 mL 含 50 µg/mL Kan 的 LB 发酵培养基中, 37 °C, 200 r/min 振荡培养 2.5 h 后加入乳糖至终浓度为 8 g/L 诱导培养 20 h。

5.3.1.4 菌体制备

将发酵液 6000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀。无菌水清洗两次, 待用。

5.3.2 固定化细胞性能的评价

5.3.2.1 固定化颗粒的机械强度考察

取相同粒径的固定化细胞颗粒 5 颗, 放置于同一水平面上, 利用砝码垂直施压, 观察颗粒的变型程度及恢复原状的情况, 分成 4 个等级: ++++ 表示颗粒形

状未发生改变；+++ 表示颗粒发生微小的形状改变，当移开砝码时快速恢复原状；++ 表示颗粒形状改变低于粒径的 1/3，移开砝码时可迅速恢复原状；+ 表示颗粒形变大于 1/3，且恢复较慢甚至不能恢复原状。

5.3.2.2 固定化颗粒包埋效果的考察

取固定化后的细胞颗粒转化天冬氨酸钠底物 24 h 后观察颗粒溶解状况，初步考察固定化细胞效果。分为 4 个等级：++++ 表示未发生溶解现象，颗粒光滑均匀，转化液清澈，无浑浊现象；+++ 表示颗粒表面光滑均匀，转化液不清澈，有浑浊现象；++ 表示固定化颗粒表面粗糙，甚至出现膨胀现象，转化液浑浊；+ 表示颗粒完全溶解。

5.3.2.3 固定化颗粒粘附程度的考察

以 PVA 为包埋材料，在固定化及转化过程中常会出现附聚现象。分 4 个等级：+++ 表示在滴加固定化颗粒时，颗粒大量附聚、粘连呈块状；++ 表示在滴加固定化颗粒时发生少量附聚，在固定化颗粒清洗后加入转化液中，200 r/min 摇床转化时发生大量粘连现象；+ 表示少量附聚；— 表示未发生固定化颗粒附聚现象，易于成型。

5.3.2.4 固定化操作难易程度的考察

分别从简易程度，耗时长短来分析细胞固定法操作难易程度。分成 4 个等级：++++ 表示耗时又不易操作；+++ 表示不易操作；++ 较容易操作；+ 容易操作。

5.3.3 细胞固定化

5.3.3.1 PVA 包埋法^[6-8]

5.3.3.1.1 PVA 冷冻包埋法

向 10 mL 无菌水加入 1 g PVA，80~90 ℃水浴溶解。待其冷却至 40 ℃左右时加入 2 g 菌体，充分混匀后倒入培养皿中，厚度约 3 mm，-20 ℃冷冻过夜，室

温冷却后用刀片将凝胶制成 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 的小方块。

5.3.3.1.2 PVA-海藻酸钙包埋法

量取 10 mL 无菌水加入到 0.5 g PVA 和 0.3 g 海藻酸钠中, $80\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴溶解。待其冷却至 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时加入 2 g 菌体, 充分混匀后用注射器滴加到 3% 的 CaCl_2 溶液中, 边滴边搅拌, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜成型。

5.3.3.1.3 PVA-饱和硼酸包埋法

称取 1 g PVA, 加入 10 mL 无菌水, $80\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴溶解。待其冷却至 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时加入 2 g 菌体, 漩涡振荡器混匀。用注射器滴入已灭菌的饱和硼酸溶液中, 边滴边搅拌, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜成型。每组做三个平行试验, 无特殊说明时, 下同。

5.3.3.1.4 PVA-卡拉胶包埋法

称取 0.5 g PVA 和 0.5 g 卡拉胶, 加入 10 mL 无菌水, $80\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴溶解。待其冷却至 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时加入 2 g 菌体, 混匀后用注射器滴加到 0.2 mol/L 的 KCl-饱和硼酸溶液中, 边滴边搅拌, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜成型。

5.3.3.2 海藻酸钠包埋法

5.3.3.2.1 成型剂的选择

称取 2 g 菌体 5 份, 分别加入 10 mL $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温浴后的 3% 的海藻酸钠溶液中, 充分混匀后将混悬液用注射器 (8 号针头) 滴加到下列不同的成型剂中: CaCl_2 , BaCl_2 , ZnCl_2 , MgCl_2 , MnSO_4 溶液, 成型剂浓度均为 3%, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜成型。

5.3.3.2.2 海藻酸钠浓度的选择

称取 2 g 菌体 3 份, 分别加入到不同浓度 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温浴的海藻酸钠溶液中: 3%, 5%, 8%。充分混匀后用注射器 (8 号针头) 逐滴加入到 3% 的 CaCl_2 溶液中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜成型。

5.3.3.2.3 菌体包埋量的选择

配制 3% 的海藻酸钠溶液, 取 10 mL 海藻酸钠溶液 4 份, 分别加入菌体至终浓度为 5%, 10%, 15%, 20%。充分混匀后用注射器 (8 号针头) 逐滴加入到 3% 的 CaCl_2 溶液中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜成型。

5.3.3.2.4 不同天冬氨酸盐底物的选择

称取3 g海藻酸钠固体4份, 分别溶于10 mL无菌水中, 加入10%菌体, 充分混匀后滴加到3%的CaCl₂溶液中, 4 ℃过夜成型。水洗后分别以不同天冬氨酸盐: 天冬氨酸钠、天冬氨酸钾、天冬氨酸铵, 天冬氨酸钙为底物转化生产β-丙氨酸。

5.3.4 固定化细胞转化

5.3.4.1 固定化细胞分批转化

将固定化细胞颗粒滤出后, 无菌水清洗2次。加入pH 6.0, 0.2 mol/L天冬氨酸钠作为底物, 37 ℃, 200 r/min转化24 h, 取样, HPLC检测。

对照: 取2 g游离菌体, 加入pH 6.0, 0.2 mol/L天冬氨酸钠溶液20 mL, 以同上条件转化, 取样, HPLC检测。

5.3.4.2 固定化细胞连续转化

以3%海藻酸钠浓度, CaCl₂作为成型剂, 菌体包埋量为10%, 以天冬氨酸钾盐作为底物, 每转化24 h作为一个批次。水洗固定化颗粒后重新加入20 mL pH 6.0, 0.2 mol/L的不同天冬氨酸钾盐进行转化, 进行下一个批次, 直至固定化颗粒溶解为止。

5.3.5 相关公式计算

$$T/\% = \frac{P}{S1 - S2} \times 100\% \quad \text{公式 5-1}$$

$$R/\% = \frac{S2}{S1} \times 100\% \quad \text{公式 5-2}$$

注: T——底物摩尔转化率

R——底物摩尔残留率

P——转化后转化液中的β-Ala的摩尔浓度 mol/L

S1——转化前底物的摩尔浓度 mol/L

S2——转化后底物的摩尔浓度 mol/L

5.4 实验结果

5.4.1 PVA 不同包埋法比较

聚乙烯醇是一种人工合成的有机多聚体凝胶，具有机械强度高，化学稳定性好，抗微生物分解性能强，对微生物无毒，价格低廉等一系列优点，是一种新型的、具有实用潜力的包埋材料，近年来在国内外获得广泛的研究。

以PVA为基本包埋载体，采用4种不同的方法固定化细胞，以天冬氨酸钠为底物，按方法5.3.3.1转化结果见图5-1。

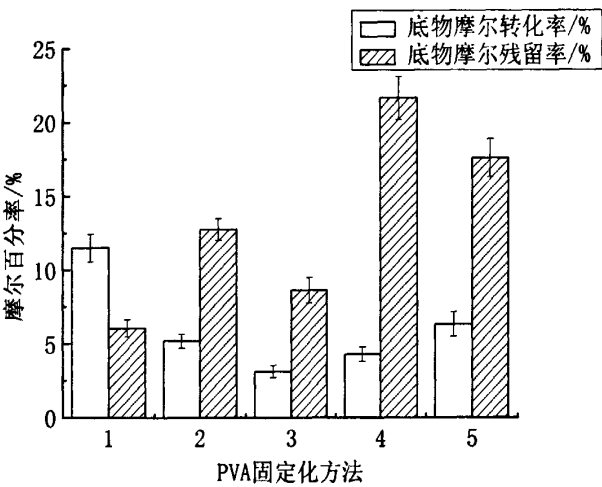


图 5-1. 四种不同 PVA 固定化细胞转化率

Fig.5-1 Conversion rate of four different immobilized cells by PVA

1: 游离菌体 2: PVA冷冻包埋法 3: PVA-海藻酸钙包埋法
4: PVA-饱和硼酸包埋法 5: PVA-卡拉胶包埋法

对上述四种固定化包埋方法的操作难易程度及机械强度等进行比较，结果见表5-1。

表5-1 不同PVA固定化方法比较

Table 5-1 Comparison of different immobilized cells by PVA

PVA固定化方法	机械强度	包埋效果	颗粒粘附程度	操作难易程度
1	+++	++	—	++++
2	+++	++	—	++
3	++++	++++	+++	+++
4	++++	++++	++	+++

注：1：PVA冷冻包埋法；2：PVA-海藻酸钙包埋法；3：PVA-饱和硼酸包埋法；4：PVA-卡拉胶包埋法

结合表5-1和图5-1综合分析可知，PVA冷冻包埋法机械强度较高，无附聚现象，底物摩尔转化率也较高，略低于PVA-卡拉胶包埋法，但是包埋效果不好，转化24 h后固定化细胞颗粒有严重的溶解现象出现膨胀现象，体积明显变大，且PVA韧性大，冷冻后难于切割，操作麻烦。

PVA-卡拉胶包埋法和PVA-饱和硼酸包埋法固定化颗粒机械强度高，包埋效果好，PVA-卡拉胶包埋法虽转化效率在四个包埋方法中效果最好，约为游离细胞底物摩尔转化率的54.8%，且底物摩尔残留率较高。由于交联PVA的饱和硼酸溶液酸性较强(pH约为4)，对细胞毒性较大，因此底物摩尔转化效率低。并且两者都出现严重的附聚现象，PVA与硼酸反应较慢，滴下时间相差不大的两液滴相接触时便粘连在一起，成球较难。PVA-卡拉胶包埋法得到的固定化颗粒在转化过程中附聚成团，通透性降低，传质阻力大。PVA-海藻酸钙包埋法机械强度不高，包埋效果也较差，固定化颗粒易于溶解。综上所述，PVA作为包埋材料并不理想，有待研究其它包埋材料。

5.4.2 海藻酸钠包埋法

海藻酸钠是一类天然高分子多糖类，对微生物无毒害作用，而且价格低廉，是包埋中常用的载体。通过实验发现，海藻酸钠固定化最大优点即为操作简单，成型易，且颗粒均匀，大小易于控制。但是颗粒机械强度较低，一些文献报道海藻

酸盐固定化颗粒在使用过程中不能抵抗细胞生长所必需的高浓度的磷酸盐, 不耐热、凝胶强度不够、易破碎溶解等不稳定性^[9~11]。

5.4.2.1 不同成型剂的选择

海藻酸钠的溶液可以与很多二价及三价阳离子反应形成凝胶。目前报道的成型剂大多是CaCl₂溶液。本文选用了5种浓度均为3%二价阳离子: Ba²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺做成型剂。结果Mg²⁺不能使海藻酸钠呈颗粒状, 其它二价阳离子做成型剂制备的固定化细胞转化结果见图5-2。

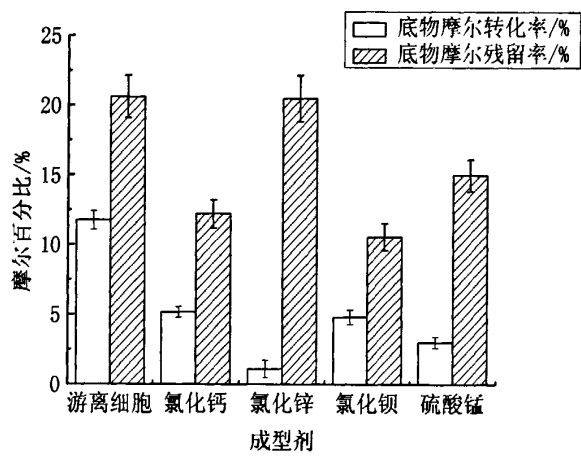


图5-2 成型剂对转化的影响

Fig.5-3 Effects of different shaping agent on conversion rate

不同成型剂固定化细胞颗粒效果见表5-2。

表5-2 不同成型剂固定化效果的比较

Table 5-2 Comparison of immobilization results with different shaping agent

成型剂	机械强度	包埋效果	颗粒粘附 程度	操作难易程 度
CaCl ₂	+++	+++	—	+
ZnCl ₂	++++	++++	—	+
BaCl ₂	++++	+++	—	+
Mn(NO ₃) ₂	+	++	—	+

以 CaCl_2 为成型剂,成型容易,颗粒均匀,直径约为3 mm,机械强度较高,包埋效果较好。底物摩尔转化率较高,约为游离状态的44%,转化24 h后转化液有少量的浑浊现象。当滴加稀盐酸溶液时,沉淀部分溶解,分析如下:成型剂中 Ca^{2+} 与天冬氨酸脱羧酶脱羧释放的 CO_2 反应,生成的 CaCO_3 沉淀,当加入盐酸后溶解。未溶解的沉淀,显微镜观察为脱落的细胞。考察固定化颗粒机械强度略有降低。

以 ZnCl_2 做成型剂得到的固定化颗粒表面光滑,机械强度高,转化效率非常低,转化48 h后,转化液仍然清澈,无任何沉淀生成。因此,尝试采用二步包埋法,即用 CaCl_2 包埋过夜后,倒去 CaCl_2 溶液,固定化凝胶颗粒水洗后加入 ZnCl_2 溶液再次固定半小时,以改善单纯用 CaCl_2 成型颗粒转化24 h后机械强度降低的缺点,又可以避免以 ZnCl_2 为成型剂转化效率低的缺陷,转化结果底物摩尔转化率低,此方法不可行。

以 $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 为成型剂,颗粒的机械强度差,转化4 h后观察,颗粒全部溶解,转化液呈咖啡色,底物摩尔转化率仅有3%。

以 BaCl_2 溶液为成型剂,海藻酸钠颗粒易于成型,机械强度高,包埋效果较好,但是底物摩尔转化率较 CaCl_2 低。综上分析,选择 CaCl_2 溶液作为成型剂。

5.4.2.2 海藻酸钠浓度的选择

海藻酸钠浓度影响固定化颗粒的机械强度,海藻酸钠浓度越高,机械强度越强,但颗粒的通透性相应降低,传质阻力增大,底物摩尔转化率降低,且难以成颗粒状,易出现拖尾现象。当海藻酸钠浓度低于3%时,海藻酸钙颗粒较难成型,机械强度低,易溶解。因此,本文主要对3%,5%,8%的浓度制备的颗粒作了研究,结果见图5-3。

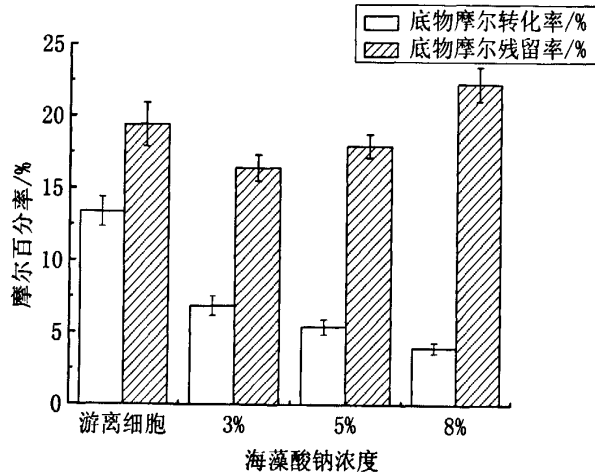


图 5-3 海藻酸钠浓度对转化的影响

Fig.5-3 Effects of different sodium alginate concentration on conversion rate

由上图可知,当海藻酸钠的浓度为3%时,底物摩尔转化率较高,约6.8%,且颗粒机械强度较好。而海藻酸钠浓度为5%时,底物摩尔转化率降低1.4%,海藻酸钙颗粒机械强度并未明显增加。当海藻酸钠浓度提高至8%时,不仅底物摩尔转化率低,固定化颗粒难以成型,有明显的拖尾现象。因此在以后的实验中海藻酸钠的浓度都选择3%。

5.4.2.3 菌体包埋量的选择

菌体包埋量是细胞固定化的一个重要指标,由于在制作固定化颗粒的过程中,不可避免的会有一部分微生物没有包埋到颗粒之中,这部分菌体不能参加底物的转化,造成菌体的浪费。以 3%海藻酸钠, CaCl_2 为成型剂,选择不同的菌体浓度包埋,对固定化颗粒的转化情况进行研究,结果见图 5-4。

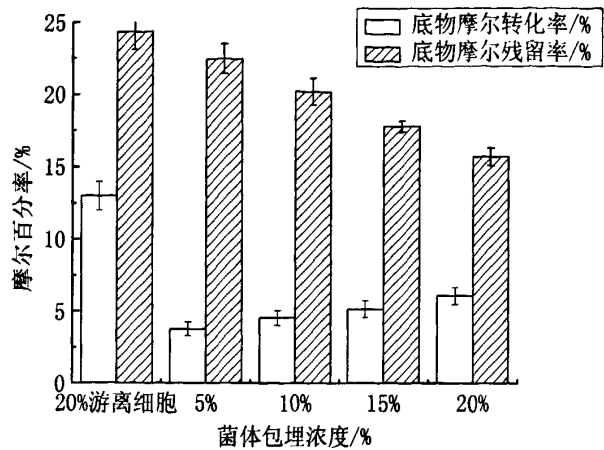


图 5-4 菌体包埋量对转化的影响

Fig.5-4 Effects of different carrier quantity on conversion rate

包埋量越高，转化效率也随着提高，但是在底物摩尔转化率提高的同时，机械强度降低。因此需要选择一个合适的包埋量。当菌体包埋量为 10% 时，底物摩尔转化率为 4.5%，且机械强度较好。当菌体包埋量为 15%，甚至更高时，底物摩尔转化率提高的同时，固定化颗粒机械强度较差，48 h 后溶解较严重。因此，选择 10% 的菌体包埋浓度。

5.4.2.4 不同天冬氨酸盐的选择

海藻酸钠的浓度为 3%，以 CaCl_2 为成型剂，包埋量为 10%，分别以 pH 6.0, 0.2 mol/L 天冬氨酸钠、天冬氨酸钾、天冬氨酸钙、天冬氨酸氨作为底物，结果见图 5-5。

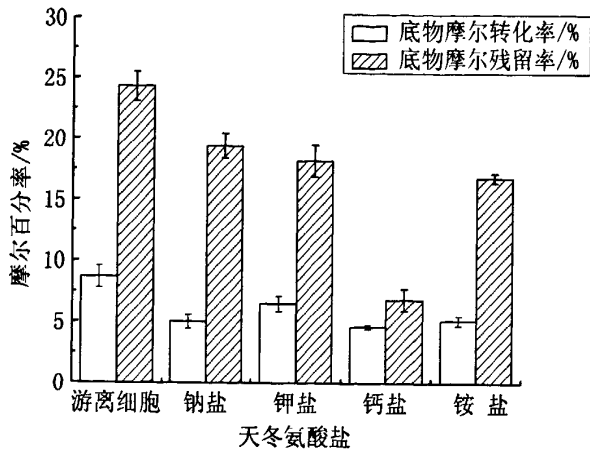


图 5-5 不同天冬氨酸盐作为底物转化结果

Fig.5-5 Effect of different sbstract of Asp on conversion rate

由上图可知，天冬氨酸钾的底物摩尔转化率最高，10%菌体包埋量可达 6.48%，其次是天冬氨酸铵，底物残留率也比较高。且天冬氨酸钾盐做底物机械强度较高，24h 后转化液仍然较澄清，天冬氨酸铵盐做为底物时出现明显的沉淀物，颗粒有部分溶解现象。综上分析，选择天冬氨酸钾盐作为底物转化生产 β -丙氨酸。

5.4.3 固定化细胞连续转化

以 3%海藻酸钠浓度， CaCl_2 作为成型剂，菌体包埋量为 10%，以天冬氨酸钾盐作为底物，每转化 24 h 作为一个批次。水洗菌体后进行下一个批次，结果见表 5-2。

表 5-3 固定化细胞连续转化结果

Table 5-3 The result of continual conversion by immobilized cells

批次	机械强度	底物摩尔转化率/%	底物摩尔残留率/%
一	++++	4.96	20.19
二	++++	4.62	23.56
三	+++	3.73	25.01
四	+++	3.89	20.70
五	++	2.89	22.66
六	+	2.87	28.91

由表 5-3 可知，固定化颗粒在做第一批次转化时，颗粒光滑均匀，机械强度高，且产物得率较高，达到 4.96%。随着批次的增加菌体逐渐出现溶解现象，机械强度降低，摩尔产物得率也随之降低。在做第四批次时摩尔产物得率出现上升情况，可能是由于固定化颗粒发生溶解现象，通透性提高，摩尔产物得率提高。在做到第六个批次时，固定化颗粒明显变小，菌体渗漏严重。

5.5 实验小结

本章分别采用PVA和海藻酸钠两种包埋材料对本实验室构建的菌株*E. coli* BL21(DE3)/pET28 b(+)-*panD*细胞进行固定化，转化生产β-丙氨酸。通过对操作的难易程度、凝胶颗粒的机械强度、底物摩尔转化率等方面进行研究。以PVA为包埋材料，研究了四种细胞固定化方法：PVA冷冻包埋法，PVA-饱和硼酸包埋法，PVA-海藻酸钙和PVA-卡拉胶复合材料包埋法。其中PVA-卡拉胶包埋法与PVA冷冻包埋法天冬氨酸转化率较高，但PVA由于黏度大，操作麻烦，且PVA-卡拉胶易出现附聚、结团现象，因此不进一步研究PVA包埋材料。

海藻酸钠是一种天然高分子多糖类，对微生物无毒害作用，价格低廉，并且操作简单，固定化颗粒易于成型，更适用于工业化固定化材料。优化后的固定化条件为：以CaCl₂为成型剂，海藻酸钠的浓度为3%，菌体包埋量为10%，以天冬氨酸钾为底物，转化24 h，底物摩尔转化率达6.48%。固定化颗粒连续转化至第五个批次时才出现明显的溶解现象。由于时间有限，固定化温度、成型剂的浓度、

成型时间等未做进一步研究,还可对新构建的菌株*E. coli* BL21(DE3)/ pET28 c(+)-*panD*培养基优化后进行固定化。

参考文献

- [1] 王新, 培军, 巩宗强等. 固定化细胞技术的研究与进展[J]. 农业环境保护, 2001, 20 (2):120-122
- [2] 曹永梅. 海藻酸钙固定化细胞及其在食品工业中的应用[J]. 中国乳业, 2001, 29 (6):34-36
- [3] Gainer J L. Use of adsorbed and covalently bound biotechnology and bioengineering[J]. Microbes in reactors, 1981, 10:35
- [3] 肖美燕, 徐尔尼, 陈志文. 包埋法固定化细胞技术的研究进展[J]. 食品科学, 2003, 24 (4): 158-161
- [4] Momein H E Katatny, Ahmed M H, et al. Improvement of cell wall degrading enzymes production by alginateencap sulated *Trichoderma* spp[J]. Food Technol Biotechnol, 2003, 41(3):219-225
- [5] 蒋宇红, 黄霞, 俞毓馨. 几种固定化细胞载体的比较[J]. 环境科学, 1993, 14 (2):11-15
- [6] 李俊安, 周建. 一种固定化酵母细胞的复合载体—PVA-海藻酸盐凝胶[J]. 微生物学报, 1995, 35(2):232-234
- [7] 陈功, 王联结. 不同方法制备 PVA 载体进行固定化细胞发酵酒精的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 249-251
- [8] 熊海燕. 包埋法制备凝胶珠条件的实验研究[J]. 饲料工业, 2007, 28(12):31-32
- [9] 彭雅娟, 问建平, 刘君. 固定化 *Gordonia sp.* WQ-01A 菌株的制备及其脱硫性能[J]. 青岛科技大学学报, 2007, 28(3):193-198
- [10] 陈晔, 韩玉洁. 海藻酸钙法固定化乳酸菌发酵制备 L-乳酸的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 1:98-100

- [11] Wadimir Wsoll. Central composite design a powerful optimization technique for enantioresolution of the racdihydroorac in the principal metabolite of the cytostatic drug roacin[J]. Journal of Biochemical and Biophysical methods, 2002, 54(3):377-390

第六章 总结与展望

采用 PCR 扩增基因技术, 以实验室保存的工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28b(+)-*panD* 为模板克隆 *panD* 基因后连接 pET28c(+)载体, 将重组质粒 pET28c(+)-*panD* 转化表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), 经 Kan 抗性筛选获得了高表达 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的工程菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28c(+)-*panD*, 乳糖诱导后酶活力达到 92.52 U/L。SDS-PAGE 分析发现新构建的菌株能正确表达的 PanD, 但由于自剪切率低, 多以无活性的酶原形式存在, 同原菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28b(+)-*panD*。

对新构建的工程菌株进行培养条件的优化, 得到最适培养条件为: 乳糖诱导时间 20 h, 乳糖浓度 12 g/L, 诱导温度为 35 °C, 诱导菌龄为 3.5 h, 诱导培养基初始 pH 5.5。通过对转化产物 β -丙氨酸的检测结果分析显示, 工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28c(+)-*panD* 在优化条件下, 酶活力达 186 U/L。与原工艺相比, 酶活力提高 101 %

将工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3) / pET28c(+)-*panD* 菌悬液进行超声波破壁后得到的粗酶液进行硫酸铵分步盐析和 Ni-亲和层析, 得到的 PanD 酶纯度大于 95%, 比活力达到了 20.15 U/mg, 纯化倍数为 6.58, 酶活回收率为 68.34%。对纯化后的酶液进行酶学性质的研究, 得到最适反应温度为 45 °C, 最适 pH 为 8.0, 在 pH 5~8 时酶较稳定, 金属离子对酶活力其几乎无影响。高温可明显提高 PanD 酶 π' -亚基的自剪切效率, 70 °C 水浴 12h 后酶活力约提高 360%。

分别以 PVA 和海藻酸钠为包埋材料固定化原菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28b(+)-*panD*, 由于 PVA 粘性大, 操作麻烦, 且易出现附聚现象, 因此重点研究海藻酸钠包埋法, 优化后的固定化条件为: 以 CaCl_2 为成型剂, 海藻酸钠的浓度为 3%, 菌体包埋量为 10%, 以天冬氨酸钾为底物, 转化 24 h, 底物摩尔转化率达 6.48%。固定化颗粒连续转化至第五个批次时才出现明显的溶解现象。

综合上述研究结果, 对今后的酶法生产 β -丙氨酸研究工作提出以下建议:

1. 培养条件优化后, 新构建的工程菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28c(+)-*panD* 酶活

力仍与工业化酶法生产 β -丙氨酸的水平相差甚远,可考虑进一步优化培养基和发酵条件来提高酶活力。

2. 第三章中发现高温水浴可提高PanD酶原的自剪切效率,从而酶活力上升。由于时间有限,为能做进一步研究,在以后的工作中可深入研究。
3. 可尝试对菌体进行高温水浴,研究是否能够提高菌体内PanD的自剪切效率,省去酶纯化的繁琐步骤。
4. 本文对包埋材料的研究仅局限在PVA和海藻酸钠两种,可放宽思路,多查阅文献,多尝试一些固定化包埋材料。

致 谢

首先,我要感谢我的导师裘娟萍教授三年来对我的谆谆教诲和栽培,裘老师严谨的治学作风、深厚的学术功底、敏锐的学术洞察力、孜孜不倦的教诲和实事求是的科研精神使我受益匪浅。每当我在研究过程中遇到问题和困难的时候,裘老师总是会耐心的与我分析和讨论,为我指明研究的方向,鼓励我坚定自己的想法,并逐步解决研究中出现的问题,从而使我的研究工作不断深入下去。在生活方面,裘老师也非常关心我们,教会我们一些做人的道理。裘老师认真负责的工作态度让我感动,在以后的学习生活中应多多向裘老师学习。

在论文完成过程中,得到许培雅老师、赵春田老师、张正波老师、朱家荣老师、黄海婵老师、鄢洪德老师、王亚军老师、应向贤老师、章银军老师、何荣军老师、郑建勇老师的精心指导和帮助,在此对他们表达我诚挚的谢意。此外还要感谢实验室其它师兄师姐、师弟师妹对我的帮助,特别感谢黄秀敏师姐、吴瑶瑶、余昌勇、虞传旺对我的关怀与帮助,使我能顺利完成实验工作。同时,我还要感谢和我一同来到浙江工业大学微生物实验室的同学们:鲍玉杰、吴艳辉、周淑芳、石圆圆、夏云重、郑巍振,大家一起走过3年,相互帮助。

最后,我要特别感谢我的父母,感谢他们二十多年来对我的培养与教育,是他们给我提供了生活的保障和情感的依靠,在我遇到困难和挫折的时候,他们总是会陪在我的身边,给我最大的支持和鼓励。在此,对他们在我成长道路上所付出的艰辛和汗水致以真诚的感谢!

洪 敏

附录 1. 高效液相色谱检测 β -丙氨酸

1.1 相关试剂及溶液的配制

1.1.1 衍生试剂的配制

A. 0.5 mol/L 碳酸氢钠溶液

准确称取碳酸氢钠 8.4 g, 加 160 mL ddH₂O 水溶解后用 NaOH 调 pH 至 9.0, 用蒸馏水定容至 200 mL, 得到 pH 9.0 的 0.5 mol/L NaHCO₃ 溶液。

B. 1.5%(w/v) 的 2, 4-二硝基氟苯乙腈溶液

准确称取 2,4-二硝基氟苯 3 g, 用色谱乙腈定容至 200 mL, 得到 1.5%(w/v) 的 2,4-二硝基氟苯乙腈溶液。

C. 0.05 mol/L 磷酸缓冲液

准确配制 1 mol/L 的 KH₂PO₄ 贮液和 1 mol/L 的 K₂HPO₄ 贮液, 分别取 61.5 mL 1 mol/L 的 KH₂PO₄ 贮液和 38.5 mL 1 mol/L 的 K₂HPO₄ 贮液混匀, 用蒸馏水将混合的两种贮液定容至 200 mL 制成 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液。

1.1.2 流动相的配制

流动相 A: 0.02 mol/L NaAc-HAc 缓冲溶液: 准确称量 1.64 g 无水乙酸钠固体, 加入 800 mL 蒸馏水溶解, 用 HAc 调节 pH 至 6.2 左右, 定容到 1000 mL。用 0.45 μ m 水相膜过滤, 待用。

流动相 B: 色谱乙腈: 用 0.45 μ m 有机膜过滤, 待用。

1.2 样品衍生方法

取样品 100 μ L, 依次加入 100 μ L 的碳酸氢钠溶液, 100 μ L 的 2,4-二硝基氟苯乙腈溶液, 混匀后置于 60 $^{\circ}$ C 避光水浴 1 h, 取出后冷却至室温。加入 700 μ L 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0), 12000 r/min 离心 30 min, 取上清待检测。

1.3 检测条件

高效液相色谱仪: Agilent 1100 series(安捷伦公司), 高效液相色谱柱: Zorbax SB-Aq 柱(安捷伦公司)。

流动相: 流动相 A: 0.02 mol/L NaAc, pH 6.2;

流动相 B: 乙腈。采用线性梯度洗脱: 时间(min)0→20, B (%) 5→33。

流速: 1.0 mL/min

柱温: 30 °C

DVD 检测工作条件: 检测波长: 360 nm; 参比波长: 600 nm

1.4 制作 β -丙氨酸标准曲线

1.4.1 标准溶液的配制

精确称量固体 β -丙氨酸 0.4 g, ddH₂O 溶解后定容至 100 mL, 得到 4 g/L 的 β -丙氨酸溶液。以此溶液为母液分别稀释至下列不同浓度的标准溶液: 4.0 g/L, 3.0 g/L, 2.0 g/L, 1.5 g/L, 1.0 g/L, 0.8 g/L, 0.6 g/L, 0.4 g/L, 0.2 g/L, 0.1 g/L。

1.4.2 样品处理

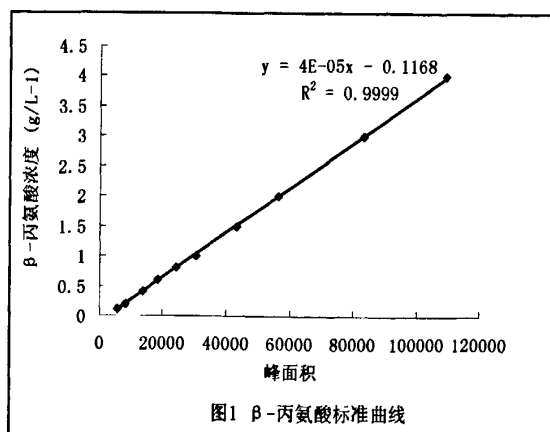
分别取 β -丙氨酸标准溶液 100 μ L 按照方法 1.2 处理样品。

1.4.3 高效液相色谱检测

参照方法 1.3 进行高相液相色谱检测, 上样量 20 μ L

1.5 实验结果

根据实验结果做标准曲线, 见图 1。



附录 2：考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量

2.1 相关试剂及溶液的配制

2.1.1 牛血清白蛋白标准溶液

准确称取 100 mg 牛血清白蛋白，溶于 100 mL 蒸馏水中，即为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的原液。

2.1.2 蛋白试剂考马斯亮蓝 G-250

称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250，溶于 50 mL 90% 乙醇中，加入 85% (W/V) 的磷酸 100 mL，最后用蒸馏水定容到 1000 mL。此溶液在常温下可放置一个月。

2.2 实验操作

2.2.1 标准曲线制作

(1) 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 标准曲线的制作：取 6 支 10 mL 干净的具塞试管，按表 1 取样。盖塞后，将各试管中溶液纵向倒转混合，放置 2 min 后用 1 cm 光径的比色杯在 595 nm 波长下比色，记录各管测定的光密度 $OD_{595\text{nm}}$ ，并做标准曲线。

表 1. 低浓度标准曲线制作

管号	1	2	3	4	5	6	7
1000 $\mu\text{g/mL}$ 标准蛋白液/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12
蒸馏水/mL	1.00	0.98	0.96	0.94	0.92	0.90	0.88
考马斯亮蓝 G-250 试剂/mL	5	5	5	5	5	5	5
蛋白质含量/ μg	0	20	40	60	80	100	120
$OD_{595\text{nm}}$							

2.2.2 样品检测

取适当样品稀释液加入到 10mL 干净的具塞试管中，用蒸馏水稀释至 1mL，再加入考马斯亮蓝 G-250 试剂 5mL，盖塞后，将各试管中溶液纵向倒转混合，放置 2min 后用 1cm 光径的比色杯在 595nm 波长下比色，记录各管测定的光密度 $OD_{595\text{nm}}$ 。

2.3 实验结果

将标准曲线数据记录于表格内，见表 2。

表 2. 低浓度标准曲线制作

管号	1	2	3	4	5	6	7
1000 $\mu\text{g/mL}$ 标准蛋白液/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12
蒸馏水/mL	1.00	0.98	0.96	0.94	0.92	0.90	0.88
考马斯亮蓝 G-250 试剂/mL	5	5	5	5	5	5	5
蛋白质含量/ μg	0	20	40	60	80	100	120
$OD_{595\text{nm}}$	0	0.058	0.177	0.271	0.343	0.44	0.503

根据上表做标准曲线，见图 2。

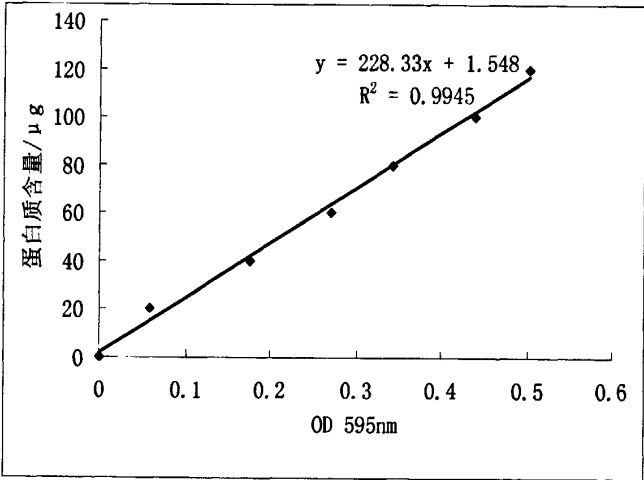


图 2 蛋白浓度标准曲线

附录 3 SDS-PAGE

3.1 相关试剂配制

- A. 分离胶缓冲液: 1.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 8.8。
- B. 浓缩胶缓冲液: 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 6.8。
- C. 30%丙烯酰胺贮液: 配制方法与连续体系相同, 称丙烯酰胺 (Acr) 29 g 及 N, N'-甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 1 g, 溶于重蒸水中, 最后定容至 100 ml, 0.45 μ m 滤膜过滤后置棕色试剂瓶中, 4 $^{\circ}$ C 保存。
- D. 10%SDS 溶液: SDS 在低温易析出结晶, 用前微热, 使其完全溶解。
- E. 10%过硫酸铵 (AP): 取 1 g 过硫酸铵固体溶解后定容至 10 mL, 现配现用。
- F. 阴极缓冲液 (10 $\times$, 1.0 mol/L Tris, 1.0 mol/L Triton, 1%SDS, pH 8.45): 将 60.55g Tris, 89.59 g Triton 及 5 g SDS 溶解于 400 mL 重蒸水中, 用 1mol/L HCl 滴定至 pH 8.45, 加水定容至 500 mL。
- G: 阳极缓冲液 (10 $\times$, 2.0 mol/L Tris, pH 8.9): 将 121.9 g Tris 溶解于 400 mL 重蒸水中, 用 1 mol/L HCl 滴定至 pH 8.9, 加水定容至 500 mL。
- H: 染色液: 0.1%考马斯亮蓝 R250, 40%甲醇, 10%冰醋酸。
- I: 脱色液: 75 mL 冰乙酸, 50 mL 甲醇用超纯水补足 1000 mL 混匀。
- J: 10%TEMED;
- K: 0.8%琼脂糖溶液: 称量 0.8 g 琼脂糖溶解于 10mL 超纯水中, 高温煮沸使其完全溶解。
- L: 5 $\times$ 载样液: 1 mol/l Tris-HCl(PH8.8) 0.6 ml
- | | |
|--------|--------|
| 10%SDS | 2 ml |
| 50%甘油 | 5 m; |
| 2-巯基乙醇 | 0.5 ml |
| 1%溴酚兰 | 1 ml |
| 水 | 0.9 ml |
| 总体积: | 10 mL |

3.2 电泳

3.2.1 玻璃板的清洗

将玻璃板浸泡在洗涤溶液中，认真清洗后用超纯水冲洗三遍，放入 60 ℃烘箱中烘干或用报纸擦干。

注意：不要将用过的未清洗的玻璃板在干燥状态下放置过夜，否则凝胶碎片发硬，粘在玻璃面上，很难清除。

3.2.2 电泳装置的装配

装配日玻璃板、隔片三明治结构。隔板两侧用 0.8%的琼脂糖密封胶。

3.2.3 12%分离胶的制备

取 100 mL 小烧杯按照表 1 配方配制分离胶溶液。

表 1 12%分离胶配方

添加溶液	体积/mL
分离胶缓冲液	7.5
30% 丙烯酰胺贮液	12
10% SDS	0.3
10% 过硫酸铵溶液	0.3
超纯水	9.9
10% TEMED	0.12

注：此配方为两块分离胶的配方，做 1 块胶时体积全部减半。

混匀后迅速用 1 mL 移液枪加入到玻璃板、隔片三明治结构中去，沿一侧边缘缓慢加入，勿使产生气泡，直至所用梳子位置的下方 1 cm 处，沿一侧缓慢加入 1 mL 超纯水密封胶，待分离胶聚合时可见在分离胶与超纯水之间会有清晰的分界线。倒出超纯水，用滤纸吸干。

3.2.4. 5%浓缩胶的制备

取 100 mL 小烧杯按照表 2 配方配制浓缩胶溶液。

表 2 5%浓缩胶的配方

添加溶液	体积/mL
分离胶缓冲液	7.5
30% 丙烯酰胺贮液	12
10% 过硫酸铵溶液	0.3
超纯水	9.9
10% TEMED	0.12

注：此配方为两块分离胶的配方，做 1 块胶时体积全部减半。

混匀后沿一侧缓慢加入分离胶的上方，勿产生气泡，将洁净干燥的梳子倾斜着从一侧边缘缓慢插入，勿使产生气泡，直至梳子完全插到底，带凝聚后加入电泳缓冲液，中间槽内加入阴极缓冲液，没过低层的玻璃板。两侧加入阳极缓冲液。

3.2.5 样品处理

将蛋白质样品:上样缓冲液=4:1 的比例混匀后沸水浴 3~5 min，4000 r/min 离心 1 min。用 25 μ L 微量注射器或 10 μ L 移液枪取样，小心加入上样孔中。

3.2.6 电泳

浓缩胶用 100 V 的电压，待至分离胶时改为 160 V 电压，待蛋白条带跑至分离胶下方约 0.5 mm 处，关闭电源，停止跑胶。

3.2.7 染色

电泳结束后将电泳胶取下，放入 15mm 的培养皿中，加入考马斯亮蓝染色液，染色 1 h，倒出染色液。

3.2.8 脱色

向装有染色结束的电泳胶的培养皿中加入脱色液，勤换脱色液至电泳胶片底色无色为止。

攻读学位期间发表的学术论文目录

发表论文:

- [1] 洪敏. L-天冬氨酸 α -脱羧酶工程菌株的构建及其培养条件研究[J]. 浙江工业大学学报, 2011, 3
- [2] 黄秀敏, 张正波, 洪敏. 生物法合成 β -丙氨酸的分离纯化的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3):46-50
- [3] 黄秀敏, 洪敏, 夏云重等. 活性炭对 β -丙氨酸生物转化液脱色效果研究[J]. 浙江工业大学学报, 2009, 37(4):376-380