肌氨酸氧化酶的酶学性质及失活机理

仝艳军[1,2]，辛 瑜[1,2]，杨海麟[1,2]，冯守帅[1,2]，张 玲[1,2]，王 武[*1,2]
（1. 江南大学 教育部工业微生物技术重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：将来源于 *Bacillus* sp.的肌氨酸氧化酶(SOX)基因在 *E. coli* 成功表达，并探索了肌氨酸氧化酶（sarcosine oxidase）酶学性质和失活机理。*Bacillus* sp. 的肌氨酸氧化酶基因克隆入载体 pET28a，并转化至 *E. coli* BL21(DE3)表达。经 IPTG 诱导 8 h，对菌体破壁液进行 SDS-PAGE 电泳分析，发现在 43 kDa 处有明显蛋白质条带。采用亲和介质分离纯化获得较高纯度 SOX。SOX 酶学性质分析结果表明，其相对分子质量为 43.8 kDa，最适反应温度 40 ℃，最适反应 pH 值为 8.0；20 mmol/L 的 Mn^{2+}对 SOX 具有明显激活作用；其动力学参数分析表明，肌氨酸作为底物时的 K_m 值为 141.6 mmol/L，V_{max} 为 0.115 mmol/(L·min)。结合 SDS-PAGE 凝胶电泳、荧光光谱和圆二色性光谱分析，探明了液态 SOX 的失活机理。在 37 ℃恒温条件下，随储存时间延长，SOX 酶分子内部疏水基团逐渐暴露且二级结构被破坏，导致酶分子变性以及最终酶活力下降。为进一步提高 SOX 的酶活稳定性提供了理论依据。

关键词：肌氨酸氧化酶；酶学性质；失活机理
中图分类号：Q 783　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2015)12—1239—09

On the Enzymatic Properties and Deactivation Mechanism of Sarcosine Oxidase

TONG Yanjun，*XIN Yu*，*YANG Hailin*，*FENG Shoushuai*，*ZHANG Ling*，*WANG Wu*[*]
（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：The sarcosine oxidase (SOX) gene from *Bacillus* sp. was expressed in *E. coli*，and the properties and deactivation mechanism were further analyzed. After transformation of the cloned DNA into host *E. coli* BL21(DE3)，the SOX gene was induced by IPTG for 8 h，a protein band of 43 kDa appeared in SDS-PAGE electrophoresis. From the crude enzyme solution，SOX in high purity was obtained through affinitive separation and purification. The analytic results of enzymatic properties showed that its relative molecular mass was 43.8 kDa，and its optimum reaction

收稿日期：2014-10-29
基金项目：国家自然科学基金项目（21306064）；江苏省创新计划项目（CXZZ12_0752）；江南大学博士研究生科学研究基金项目（JUDCF12013）。
作者简介：仝艳军(1986—)，女，山东荷泽人，工学博士，食品科学与工程博士后，主要从事耐热肌氨酸氧化酶基因表达、纯化及酶稳定性研究。E-mail：yanjun1986927@163.com
*__通信作者__：王　武(1952—)，女，福建福州人，教授，博士研究生导师，主要从事酶分子改造，遗传工程和发酵工程研究。E-mail：bioprocessor@aliyun.com；wangwu@jiangnan.edu.cn

temperature and pH value were 40 ℃ and 8.0,respectively. Moreover,20 mmol/L Mn^{2+} exhibited an obvious activation effects on recombinant SOX. The kinetic parameters of Km and Vmax were determined as 141.6 mmol/L and 0.115 mmol/(L·min) when sarcosine used as a substrate. With the SDS-PAGE gel electrophoresis,fluorescence and circular dichroism spectroscopy,the deactivation mechanism of SOX was further studied. At constant temperature 37 ℃,the internal hydrophobic group of SOX molecule was gradually exposed and its secondary structure was destroyed along with the prolonged storage time,leading to the denaturation of SOX protein and the lowering down of its activity. The above results provide a theoretical basis for improving SOX stability in future.
Keywords: sarcosine oxidase,enzymatic properties,deactivation mechanism

肌氨酸氧化酶 (sarcosine oxidase;SOX;EC 1.5.3.1)属于黄素蛋白质,可偶联肌酐酶和肌酸酶将肌酐降解为甘氨酸、甲醛和过氧化氢[1]。作为一种重要的诊断酶制剂,SOX 被广泛应用于人体血清中肌酐水平的检测,用来判断肾功能的健康程度[2]。

肌酐检测已成为医疗机构常规的检测项目,SOX 临床需要量较大。目前,采用基因工程实现 SOX 的异源高效表达是满足其临床诊断应用的有效手段。*E. coli* 作为常用的表达宿主菌,具有发酵成本低、产量高、易于操作、遗传背景清楚、繁殖周期短和易于调控等诸多优点,被普遍认为是重组蛋白质生产的首选体系[3-5]。尤其,由于不同生物来源的 SOX 酶学性质差异较大,会直接影响其应用效果,如相对分子质量及亚基组成和蛋白质组成等[6-9]。因此,深入探索 SOX 酶学性质变得非常重要。此外,诊断酶试剂的稳定性普遍较差也是限制该类酶制剂实际应用的重要因素[10-12]。而翔实的酶分子失活机理研究是有效提高酶稳定性的基本前提。

研究中将 *Bacillus* sp.BSD-8 来源的 SOX 在 *E. coli* 中进行异源重组表达,采用亲和层析获得纯度较高的目的蛋白质。在此基础上,作者对 SOX 的酶学性质进行研究,并采用 SDS-PAGE 凝胶电泳、荧光光谱和圆二色性光谱等方法探讨 SOX 的失活机理,为该 SOX 的稳定性研究奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

克隆宿主菌 *E. coli* JM109,表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)和重组菌 *E. coli* JM109/pUC57-*sox*,由作者所在实验室保藏;质粒 pET28a,购自 Novagen 公司。

1.2 主要材料

限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ,*Hind* Ⅲ,T4 DNA 连接酶,*Taq* DNA 聚合酶,250 bp DNA 分子量标准品,蛋白质分子量标准品,均购自 TaKaRa 公司(大连);胶回收试剂盒,质粒提取试剂盒,IPTG,卡那霉素,均购自上海生物工程有限公司;其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.3 主要仪器

电热恒温水浴锅,上海医疗器械五厂制造;F-7000 型荧光分光光度仪,日立公司制造;蛋白质电泳仪,美国 BIO-RAD 公司制造;MOS-450 AF 圆二色性光谱仪,法国 Bio-Logic 公司制造;pHS-3TC 型 pH 计,德国赛多利斯股份有限公司制造。

1.4 肌氨酸氧化酶基因工程菌的构建

重组质粒的构建策略如图 1 所示。将含有 pET28a 载体的重组菌和含有 pUC57-*sox* 的重组菌分别接种于含 *Kan* 的 LB 液体培养基中,37 ℃,200 r/min 培养过夜,将得到的菌液用于质粒的提取。经 PCR 扩增纯化后的目的基因和 pET28a 质粒分别经 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切,产物经凝胶电泳后分别纯化回收。在 16 ℃,T4 DNA 连接酶的作用下连接。连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,在含 100 μg/mL *Kan* 的 LB 平板上选取阳性转化子,提取重组质粒,进行双酶切电泳鉴定;并挑取阳性克隆送上海生物工程有限公司测序。将经过测序鉴定正确的重组质粒 pET28a-*sox* 转化表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,并将转化产物涂布于含有 *Kan* 的 LB 固体培养基中,并挑取重组转化子单菌落接种于 LB 液体培养基中,培养后提取质

粒进行鉴定。

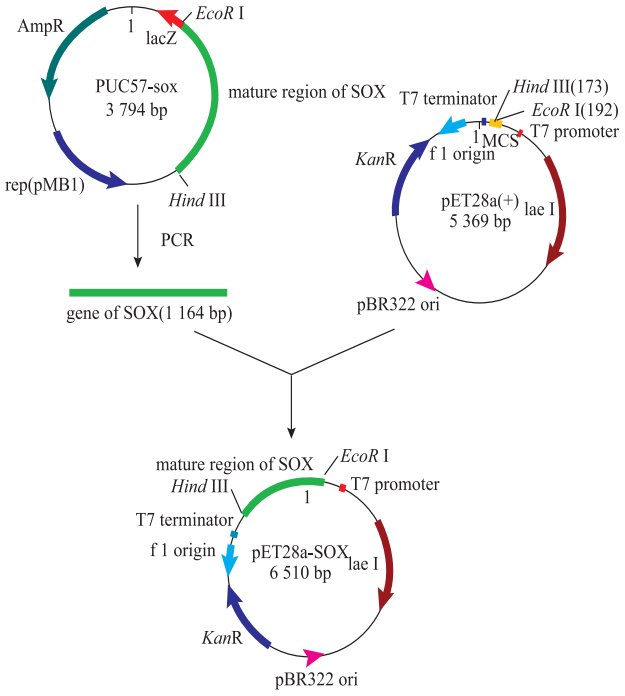


图 1　重组表达载体 pET28a–*sox* 的构建流程

Fig. 1　Construction of recombinant plasmids pET28a–*sox*

1.5　重组质粒在 *E. coli* 中的诱导表达

挑取阳性 *E. coli* 重组转化子单菌落接种于 50 mL 含 *Kan* 的 LB 液体培养基,于 37 ℃,200 r/min 振荡过夜。按体积分数 5%的接种量转接于 50 mL 含 *Kan* 的 LB 液体培养基中,于 37 ℃ 200 r/min 振荡至菌体浓度 OD_{600} 约为 0.6~0.8,加入 IPTG 达到终浓度为 1 mmol/L 进行诱导,继续培养 8 h。8 000 r/min,4 ℃离心 5 min 收集菌体,用 20 mmol/L pH 8.0 的 Tris–HCl 缓冲液洗涤悬浮菌体,冰水浴超声破碎菌体,获得待测酶液。同时以不加 IPTG 诱导的重组菌和一个经 IPTG 诱导的非重组菌作为对照,进行 SDS–PAGE 凝胶电泳鉴定。

1.6　肌氨酸氧化酶酶活测定

以肌氨酸为底物,参照文献方法测定[13],取 50 μL 不同浓度的 SOX 酶液,分别加入 3 mL 显色液于 1 mmol/L 的 4–氨基安替比林、6 mmol/L 的苯酚、7 000 U/L 的辣根过氧化物酶、20 mmol/L 的 Tris–HCl 缓冲液(pH 8.0)中,混匀后加入 150 μL 肌氨酸(0.2 mol/L),振荡混匀,于 37 ℃水浴反应 5 min,结束后沸水浴煮沸 3 min 终止反应,冷却,于 500 nm 下测定吸光度。酶活单位定义为:在 37 ℃下,每分钟转化 1 μmoL 肌氨酸产生甲醛所需的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。

1.7　重组肌氨酸氧化酶的纯化及酶学性质

1.7.1　肌氨酸氧化酶的纯化　从固体平板挑取单菌落,接入种子培养基,37 ℃培养过夜。按照体积分数 5%的接种量接入发酵培养基,37 ℃,200 r/min 培养至 OD_{600} 0.6~0.8 后,采用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 8 h。菌液破壁离心后,取酶上清液进行纯化,参照文献[14],纯化后的酶液置于 4 ℃保存备用。

1.7.2　酶的最适反应温度和最适 pH 值的测定　在 pH 8.0、20 mmol/L Tris–HCl 缓冲液体系中,在 20~80 ℃范围内测定不同温度下的酶活力,观察温度对酶活性的影响,以确定酶的最适反应温度;在不同 pH 的反应体系(pH 4.0~11.0)中测定 SOX 的酶活力,以酶活力最高的记为 100%,计算其他 pH 条件下的相对酶活力,确定酶促反应的最适 pH。不同 pH 的缓冲液体系为柠檬酸–柠檬酸钠缓冲液(pH 4.0~5.0),磷酸–磷酸钾缓冲液(pH 6.0~7.0),Tris–HCl 缓冲液(pH 8.0~9.0),碳酸氢钠–NaOH 缓冲液(pH 10.0~11.0)。

1.7.3　酶的热稳定性和 pH 稳定性分析　在 pH 8.0、20 mmol/L Tris–HCl 缓冲液体系中,0~80 ℃系列梯度范围内保温 10 min,测定其对应的剩余酶活力,以观察酶的热稳定性。另外,将一定量的酶液分别置于一系列不同 pH 的缓冲液中,37 ℃放置 2.5 h 后,测定其对应的剩余酶活力,以观察酶的 pH 稳定性。不同 pH 的缓冲液体系同 1.7.2。

1.7.4　金属离子对酶活力影响的测定　在不同反应体系中分别加入不同的金属离子 Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{3+}、Co^{2+}、Cu^{2+}和 Zn^{2+},设置 3 个终浓度梯度为 2.0、20、100 mmol/L,分别混匀在 37 ℃水浴中保温 2.5 h,测定各组酶活力。以未加入金属离子的酶液的活性为 100%,计算各组的相对酶活力,以观察金属离子对酶活性的影响。

1.7.5　SOX 酶动力学参数的测定　用 pH 8.0 的 Tris–HCl 缓冲液配制浓度分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mmol/L 的肌氨酸溶液,于 37 ℃反应 5 min 的条件下测定 SOX 在不同肌氨酸浓度时的初始氧化活力。得到反应速度 V 和 $1/V$。根据 Lineweaver–Burk 双倒数作图法,以 $1/[S]$为横坐标,$1/V$ 为纵坐标作图,计算 SOX 对肌氨酸的 K_m 和 V_{max}。

1.8　肌氨酸氧化酶失活机理的分析方法

1.8.1　SOX 酶活力测定　酶活力 12 U/mL、pH 8.0

的 SOX 酶液置于 37 ℃恒温水浴中，定时取样测定其剩余酶活，设水浴前 SOX 酶液的酶活力为 100%，计算 37 ℃放置不同时间后的酶活保留率，重复 3 次取平均值。

1.8.2 SDS-PAGE 凝胶电泳分析　酶活力 12 U/mL、pH 8.0 的 SOX 酶液置于 37℃恒温水浴中，定时取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析，水浴前 SOX 酶分子溶液样品作为对照，检测 SOX 酶分子在储存过程中是否存在聚集或降解现象。

1.8.3 荧光光谱鉴定　利用 F-7000 型荧光分光光度计对 37℃储存不同时间的 SOX 酶溶液内源荧光及 FAD 荧光光谱进行分析。内源荧光实验条件为：激发波长 280 nm，扫描范围 280~400 nm，狭缝宽度 5.0 nm，检测步长 1 nm。FAD 辅基荧光实验条件为：激发波长 460 nm，扫描范围 460~620 nm，狭缝宽度 5.0 nm，检测步长 1 nm。

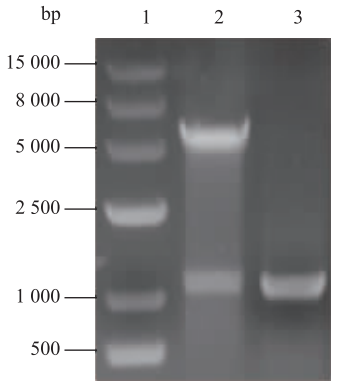
1.8.4 圆二色性光谱分析　使用 MOS-450AF 圆二色性光谱仪对 37 ℃储存不同时间的 SOX 酶液进行分析，扫描范围为 200~250 nm，检测步长 1 nm，响应时间 2 s，狭缝宽度 4.0 nm，比色皿宽度 1 mm，以不含有 SOX 的相同缓冲液体系为背景，测定椭圆率(θ)，计算摩尔椭圆率[θ]。

2 结果与分析

2.1 重组质粒鉴定及目的产物诱导表达

2.1.1 重组质粒的鉴定　将全合成的 *sox* 基因成功构建在 pUC57 载体，以 pUC57-*sox* 为模板进行 PCR 扩增。扩增的目的条带和 pET28a 质粒经 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切纯化后连接，构建重组质粒 pET28a-*sox*。从转化子中提取重组质粒 pET28a-*sox*，采用限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ进行双酶切验证，同时重组质粒进行 PCR 扩增，结果如图 2 所示，泳道 2 为双酶切后的重组质粒，在 1 000 bp 和 5 000 bp 处出现两条特异性条带，分别对应 *sox* 和 pET28a 片段。该结果初步验证了重组质粒 pET28a-*sox* 已成功构建。

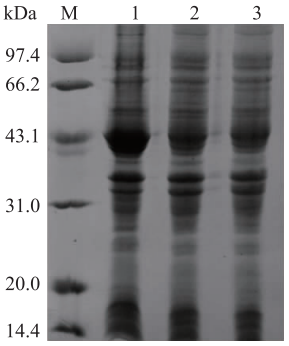
2.1.2 目的产物的诱导表达及 SDS-PAGE 检测　诱导表达后的菌体经超声破碎处理，获得粗酶液并进行 SOX 酶活的测定和 SDS-PAGE 分析。如图 3 所示。*E.coli* BL21 (DE3)/pET28a-*sox* 菌体经 IPTG 诱导后，其细胞破壁液中发现相对分子质量约 43 kDa 蛋白质特异条带，表达量约占总细胞蛋白质的 30%，SOX 在 *E. coli* 中已成功表达。后续实验采用乳糖优化诱导表达，其产酶水平和生产强度可达 4.0 U/mL 和 91.2 U/(L·h)。



1：DNA 相对分子质量标准；2：pET28a-*sox*/*EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切产物；3：PCR 产物。

图 2　重组质粒 pET28a-*sox* 的双酶切与 PCR 验证

Fig. 2　Identification of expression plasmid pET28a-*sox* by restriction digestion and PCR



M：蛋白质相对分子质量标准；1：*E.coli* BL21 (DE 3)/pET28a-*sox* 的 IPTG 诱导表达产物；2：*E.coli* BL21 (DE 3)/pET28a-*sox* 的 IPTG 未诱导表达产物；3：*E.coli* BL21(DE 3)/pET28a 的 IPTG 诱导表达产物。

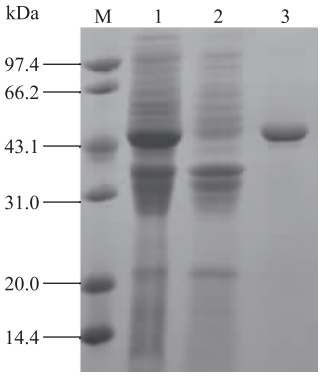
图 3　表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3　Analysis of SOX expression by SDS-PAGE

2.2 重组肌氨酸氧化酶的酶学性质

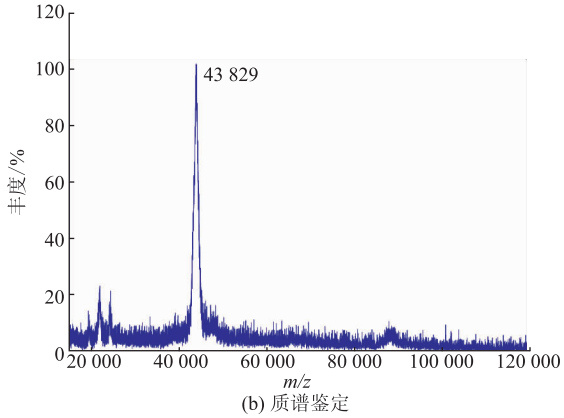
2.2.1 重组肌氨酸氧化酶的纯化　收集湿菌体后，采用 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)清洗后离心，去除上清液后重新将菌体悬浮于 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中超声波破碎。破壁条件为 4 min /1 min(超声时间/间歇时间)，破壁时间为 20 min，至溶液变澄清，即获得粗酶液。采用 Sepharose-4-氨基吡咯-2-羧酸亲和层析纯化 SOX；用 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)平衡亲和层

析柱，再将粗酶液进样层析柱，采用 0.03 mol/L NaCl/20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)洗脱目的蛋白质,纯化经 SDS-PAGE 分析,如图 4(a)所示,在相对分子质量 43 kDa 处有明显单一蛋白质条带。经 Sephrose-4-氨基吡咯-2-羧酸亲和纯化,粗酶液中杂蛋白质基本除去,纯化的 SOX 达到电泳纯,比酶活为 30.8 U/mg,酶活回收率91.2%。采用 MALDI-TOF 对 SOX 相对分子质量进行鉴定,结果见图 4(b),该重组蛋白质相对分子质量43.8 kDa,与来源 *Bacillus* sp. B-0618 的 SOX(43 839 Da)相近[15];纯化后的样品置于 4 ℃保存备用。



M:蛋白质相对分子质量标准; 1:粗酶液; 2:亲和层析流出液;3:亲和层析洗脱液。

(a) SDS-PAGE图谱

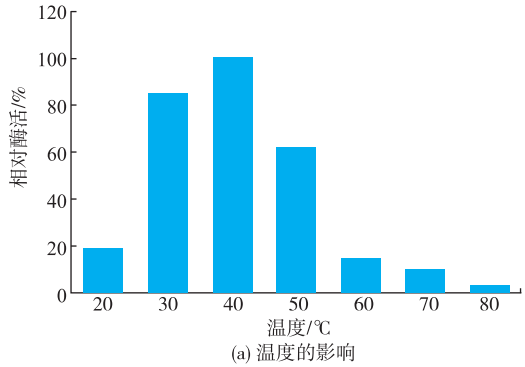


(b) 质谱鉴定

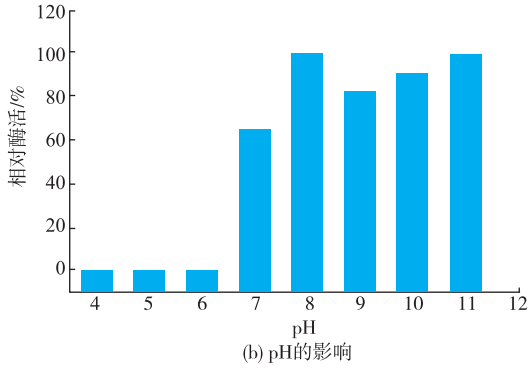
图 4　纯化的肌氨酸氧化酶的 SDS-PAGE 图谱及质谱鉴定图谱

Fig. 4　SDS-PAGE and mass spectrum analysis of purified SOX

2.2.2　SOX 最适反应温度和 pH 值　温度和 pH 值是影响酶反应速率的重要因素,酶分子只在一定温度和 pH 范围内具有酶活性,对 *Bacillus* sp. SOX 的最适反应温度和最适 pH 值进行分析。由图 5(a)可知，该 SOX 在 20~80 ℃范围内均具有一定的酶活性,其最适反应温度为 40 ℃。由图 5(b)可知,在 pH 8.0~11.0 范围内，该重组酶具有较高的酶活力,在 pH 8.0 和 pH 11.0 的反应体系中可以获得相同的酶活。据文献报道[7,16],SOX 在催化底物时,肌氨酸以兼性离子形式结合于 SOX 活性中心;而在脱甲基氧化过程中,肌氨酸则是以阴离子形式存在。底物的结合受到 pKa 7.4 和 10.2 两个离子化参数的影响。对于肌氨酸其 α-氨基的解离常数 pKa 为 10.01,在 pH 8.0 的体系中,肌氨酸以适宜浓度的兼性离子存在,促进酶与底物的结合;在 pH 11.0 的体系中,肌氨酸其 α-氨基已去质子化状态,以较适浓度的阴离子形式存在,促进催化作用的进行。因此 SOX 在 pH 8.0 和 pH 11.0 的体系中呈现较高的酶活力。



(a) 温度的影响



(b) pH的影响

图 5　温度及 pH 对 SOX 酶活力的影响

Fig. 5　Effect of temperature and pH on SOX activity

2.2.3　SOX 的热稳定性及 pH 稳定性　酶液置于 0~80 ℃不同水浴温度保温 10 min,如图 6(a)所示,SOX 在 50 ℃以下具有较好的热稳定性，剩余酶活可以保持在 80%以上。将 SOX 在不同的 pH 体系下 37 ℃放置 2.5 h,如图 6(b)所示,SOX 在 pH 7.0~10.0 体系中具有较好的 pH 稳定性,37 ℃下放置

2.5 h,其剩余酶活仍保持在 80%以上。在 50 ℃以下或者 pH 7.0~10.0 体系中,SOX 均可以保持其正确的空间构象。

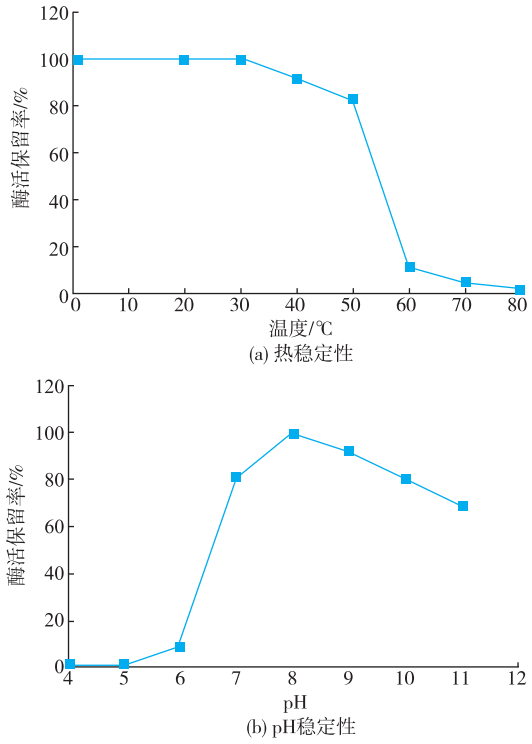


图 6 SOX 的热稳定性和 pH 稳定性分析

Fig. 6 Analysis on thermal stability and pH stability of SOX

2.2.4 *金属离子对肌氨酸氧化酶活性的影响* SOX 对不同金属离子的耐受性具有较大的差异,SOX 在不同浓度(2.0、20、100 mmol/L)金属离子体系中放置 2.5 h(37 ℃)后,结果如图 7 所示。不同浓度的 Na^+、K^+及 Ca^{2+}对 SOX 酶活力基本没有影响;Mn^{2+}和 Mg^{2+}对 SOX 酶活力具有不同程度的激活作用,并呈现不同的变化趋势;Mg^{2+}对 SOX 酶活力的激活作用随着 Mg^{2+}浓度的增加而减小;而 Mn^{2+}的激活作用随着 Mn^{2+}浓度的增加先增加后减小,在 20 mmol/L 的体系下其相对酶活力达到最大为 145.7%。Fe^{3+}在低浓度下对酶活性基本没有影响,Zn^{2+}和 Cu^{2+}对 SOX 酶活力均有较强的抑制作用,在 Zn^{2+}和 Cu^{2+}体系中,SOX 均出现了聚沉现象。Co^{2+}在低浓度体系中对酶活性基本没有影响,并在 20 mmol/L 的体系具有激活作用,其相对酶活力可以达到 126.9%,然而在 100 mmol/L 的体系中则表现出较强的抑制作用并出现聚沉现象。某些金属离子在合适的浓度范围内,可能通过与酶表面的原子或基团发生相互作用而使 SOX 的构象发生一定的变化,使酶分子中的电子传递进行得更加流畅,因而表现为激活作用[17]。而某些金属离子如 Zn^{2+}和 Cu^{2+}表现为强烈的抑制作用,则可能是由于 Zn^{2+}和 Cu^{2+}可导致酶分子疏水基团的暴露,导致聚集的发生和酶蛋白质的失活。其作用和其他Ca^{2+}、Mg^{2+}和 Mn^{2+}等二价金属离子不同,可能与 Zn^{2+}和 Cu^{2+}特殊的化学性质有关[18]。

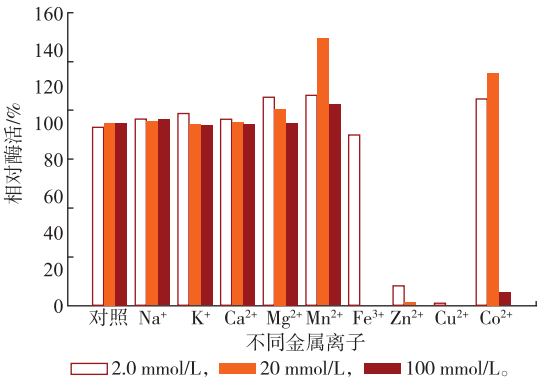


图 7 不同金属离子对 SOX 酶活力的影响

Fig. 7 Effect of various metal ions on the activity of SOX

2.2.5 *动力学参数的测定* 米式常数 K_m 是酶的一个特征常数,可用于判断酶的专一性,K_m 值越小,说明酶与底物的亲和力越大,该底物越适宜作为该酶的天然底物。在 pH 8.0 条件下,SOX (10 U/mL)与 1~10 mmol/L 浓度梯度的肌氨酸于 37 ℃反应 5 min,测定 SOX 酶活力。根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法绘图,结果如图 8 所示,其米氏方程为

$$Y=1\ 232.5X+8.701\ 2$$

相关系数为 0.994 7;计算得 *Bacillus* sp SOX 对肌氨酸的 K_m 及 V_{max} 值分别为 141.6 mmol/L 和 0.115 mmol/(L·min)。来源不同的 SOX 对肌氨酸的 K_m 值具有一定的差异性,如来源于 *Corynebacterium* 的 SOX 对肌氨酸的 K_m 值为 21 mmol/L[19]。

2.3 肌氨酸氧化酶失活机理

2.3.1 *SOX 酶分子失活的表观现象* 造成酶分子不稳定的因素有很多,如氨基酸消旋、脱酰胺、氧化,温度和 pH 等。通过对 SOX 酶学性质研究发现,SOX 在 pH 8.0~10.0 之间相对稳定,选择酶活力 12 U/mL,pH 8.0,37 ℃的条件下观察酶失活现象。如图9(a)所示,随着储存时间的延长,酶活保留率逐渐降低;在前 3 d 内,酶活保留率下降速度缓慢,约下降了 18%,而后的 4 d 内酶活保留率下降较为

明显，到 7 d 时下降至 7.9%。SOX 在储存过程中，随着储存时间的延长出现沉淀；经同步 SDS-PAGE 凝胶电泳分析（见图 9(b)），在 SOX 失活过程中，表现为目的条带逐渐变细，并出现蛋白质聚集现象。

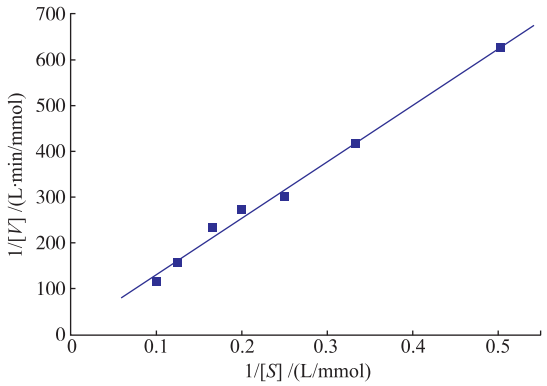
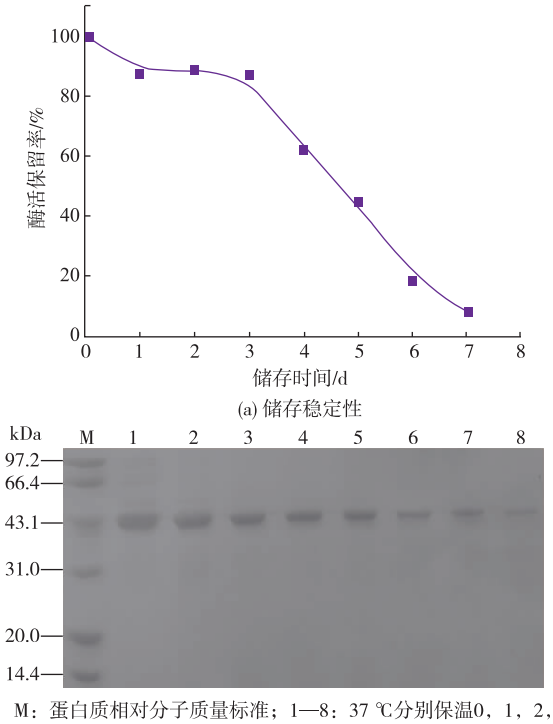


图 8　SOX 的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 8　Lineweaver-Burk graph of recombinant SOX



(a) 储存稳定性

M：蛋白质相对分子质量标准；1—8：37 ℃分别保温0，1，2，3，4，5，6，7 d。

(b) SDS-PAGE分析贮藏过程中SOX蛋白质条带的变化

图 9　SOX 的储存稳定性曲线及 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Fig. 9　The weakening of SOX enzymatic stability and protein banding at different storage period

2.3.2　疏水基团暴露性分析　通过内源荧光光谱法测定酶分子内部发色基团的变化，表征其结构的变化。酶分子中能发生荧光的氨基酸残基有 Trp、Tyr 和 Phe 残基，由于能量的转移和传递，酶分子的荧光主要表现为 Trp 和 Tyr 残基。SOX 由 387 个氨基酸残基组成，其中含有 3 个 Trp 和 21 个 Tyr 残基；FAD 作为 SOX 的辅基，含有异咯嗪环，有长共轭结构的 π — π* 跃迁，具有荧光性[20]。在酶分子结构解折叠时，内源性的疏水性残基（Trp 和 Tyr）逐步暴露出来，导致 Trp 和 Tyr 残基周围的微环境的极性逐渐增强，酶分子的最大发射波长发生移动（荧光光谱红移）；另外，伴随疏水基团的暴露，荧光强度逐渐上升。如图 10 所示，随着储存时间的延长，SOX 的最大发射波长由 328 nm 移向 338 nm，荧光光谱发生红移，最大荧光强度也逐渐增加，并在储存 3 d 时趋于稳定。

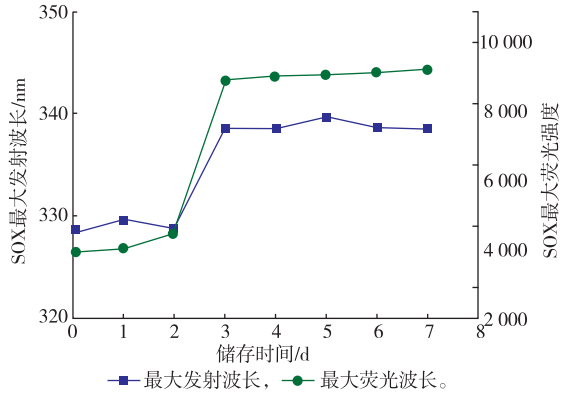


图 10　储存不同时间的 SOX 的荧光光谱图分析

Fig. 10　Analysis of flurorescence on SOX under different storage period

SOX 酶分子在储存 7 d 之内，其内部结构基本暴露，二级结构基本丧失，FAD 辅基基本暴露；如图 11 所示，FAD 的最大发射波长未发生偏移，最大荧光强度在储存 3 d 后略有增加，表示 FAD 逐渐暴露于溶液中。通常 SOX 与 FAD 结合摩尔比为 1:1，大肠杆菌不能为 SOX 提供充足的 FAD，而且 FAD 自身不能进入细胞，只能通过将核黄素运输至胞内，并经浓缩和磷酸化作用转化为 FAD 辅基[21-22]，推断 SOX 大量表达的过程中，由于 FAD 合成速度有限，SOX 未能完全结合 FAD 辅基。综上所述，推断 SOX 在储存过程中，SOX 疏水基团逐渐暴露在溶液中，随之酶活性逐渐降低，荧光强度增强；另外，大肠杆菌表达过程中未能提供足量的 FAD，表达的 SOX 未能充分结合 FAD 辅基。

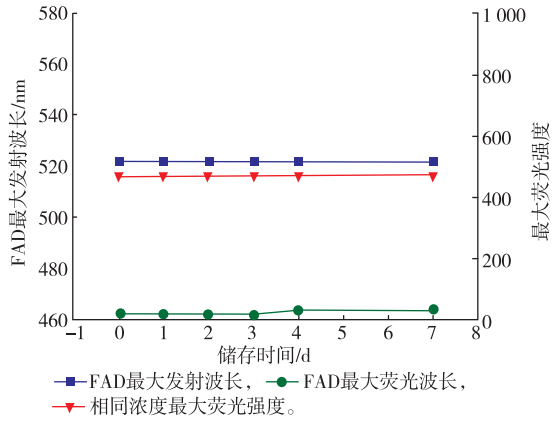


图 11 储存不同时间的 FAD 的荧光光谱图分析

Fig. 11 Analysis of fluorescence on FAD under different storage period

2.3.3 *二级构象的变化* 酶分子中光活性发色基团的不对称性及折叠结构的差异性会引起左右两圆偏振光具有不同的光吸收，表现为圆二色性，常用于溶液中蛋白质二级结构变化的研究。在蛋白质二级结构中，α-螺旋在 208 nm 和 222 nm 处有两个负的特征吸收峰，β-折叠在 216 nm 处有一负光谱带，β-转角在 206 nm 附近有一正吸收峰[23]。将置于 37 ℃保温不同时间的 SOX 酶液进行圆二色性光谱分析，结果如图 12 所示，SOX 初始时的二级结构特征吸收峰较为完整，但 37 ℃恒温水浴放置 7 d 后，SOX 酶分子的二级结构特征吸收峰完整性降低，天然构象破坏，酶分子活性降低，其剩余的相对酶活不足 10%。

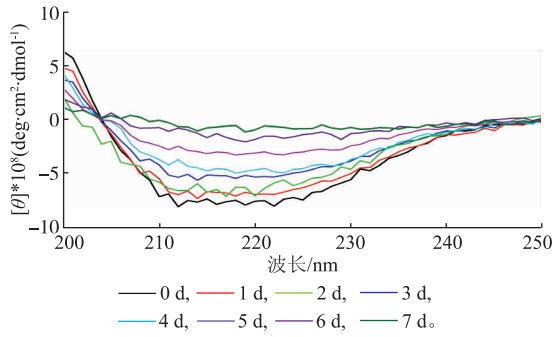


图 12 不同储存时间下 SOX 酶分子的圆二色性光谱分析

Fig. 12 Analysis of circular dichroism of SOX in far-UV region under different storage periods

3 结 语

肌氨酸氧化酶在临床诊断具有重要的应用价值。研究采用基因工程技术，实现了 *Bacillus* sp.肌氨酸氧化酶的异源高效表达。SOX 酶学性质分析表明，*Bacillus* sp.肌氨酸氧化酶为单亚基的蛋白质，肽链相对分子质量为 43.8 kDa，最适反应温度为 40℃，最适反应 pH 为 8.0；SOX 的动力学参数分析表明，在以肌氨酸为底物时，K_m 值为 141.6 mmol/L，V_{max} 为 0.115 mmol/(L·min)。结合 SDS-PAGE 凝胶电泳、荧光光谱和圆二色性光谱等方法，研究了液态 SOX 的失活机理。来源于 *Bacillus* sp.的 SOX 酶液于 37 ℃恒温放置过程中，SOX 酶分子内部疏水基团逐渐暴露，同时二级结构逐渐破坏，SOX 酶分子变性，导致酶活力下降。SOX 失活机理的探明，为后续提高 SOX 的稳定性奠定了理论基础。

参考文献：

[1] Suzuki M. Purification and some properties of sarcosine oxidase from *Corynebacterium* sp. U-96 [J]. **Journal of Biochemistry**, 1981,89(2):599-607.

[2] Nagata K,Sasaki H,Hua M,et al. Crystal structure of monomeric sarcosine oxidase from *Bacillus* sp. NS-129 reveals multiple conformations at the active-site loop[J]. **Proceeding of the Japan Academy series B**,2005,81(6):220-224.

[3] Sorensen H,Mortensen K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli* [J]. **Journal of Biotechnology**,2005. 115(2):113-128.

[4] Choi J,Lee S. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2004,64(5):625-635.

[5] Andersen D,Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2002,13(2):117-123.

[6] Guo K,Ma X,Sun G,et al. Expression and characterization of a thermostable sarcosine oxidase (SOX) from *Bacillus* sp. in *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2006,73(3):559-566.

[7] Wagner M,Trickey P,Chen Z,et al. Monomeric sarcosine oxidase:Flavin reactivity and activity site binding determinants[J].

Biochemistry，2000，39(30)：8813-8824.

[8] Lee S，Jia B，Pham B，et al. Architecture and characterization of sarcosine oxidase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1[J]. **Extremophiles**，2012，16(1)：87-93.

[9] Hassan-Abdallah A，Zhao G. Cloning，expression and crystallization of heterotetrameric sarcosine oxidase from *Pseudomonas maltophilia*[J]. **Protein Expression and Purification**，2005，43(1)：33-43.

[10] 张玉然，辛瑜，杨海麟，等. 黄嘌呤氧化酶酶学性质及共价交联固定化[J]. 食品与生物技术学报，2014，33(1)：16-21.
ZHANG Yuran，XIN Yu，YANG Hailin，et al. Enzymatic properties of xanthine oxidase and its covalent immobilization on different supports[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**，2014，33(1)：16-21.（in Chinese）

[11] Tong Y，Xin Y，Yang H，et al. Efficient improvement on stability of sarcosine oxidase via poly-lysinemodification on enzyme surface[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**，2014，67：140-146.

[12] 苏二正，夏涛，宛晓春，等. 单宁酶和β-葡萄糖苷酶的共固定化[J]. 食品与生物技术学报，2006，25(1)：40-44.
SU Erzheng，XIA Tao，WAN Xiaochun，et al. Study on the co-immobilization of tannase and β-glucosidase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**，2006，25(1)：40-44.（in Chinese）

[13] Inouye Y，Nishimura M，Matsuda Y，et al. Purification and characterization of sarcosine oxidase of Streptomyces origin [J] **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**，1987，35(10)：4194-4202.

[14] Tong Y，Xin Y，Yang H，et al. Novel affinity purification of monomeric sarcosine oxidase expressed in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Separation Science**，2013，36(18)：3086-3092.

[15] Wager M，Khanna P，Jorns M. Structure of the flavocoenzyme of two homologous amine oxidase：monomeric sarcosine oxidase and N-methyltryptophan oxidase[J]. **Biochemistry**，1999，38(17)：5588-5595.

[16] Zhao G，Jorns M. Ionization of zwitterionic amine substrates bounds to monomeric sarcosine oxidase [J]. **Biochemistry**，2005，44(51)：16866-16874.

[17] 方华，陈俊，陈婴，等. 缓冲体系和金属离子对漆酶催化活性的影响[J]. 武汉理工大学学报，2009，31(5)：27-30.
FANG Hua，CHEN Jun，CHEN Zhao，et al. Effect of buffer solutions and metal ions on the laccase activity [J]. **Journal of WuHan University of Technology**，2009，31(5)：27-30.(in Chinese)

[18] 刘陶陶，王希成. 铜离子对海参精氨酸激酶活力与结构的影响[J]. 海洋科学，2011，35(1)：17-21.
LIU Taotao，WANG Xicheng. Effects of Cu^{2+} on Arginine kinase：activity changes，conformational changes，and aggregation[J]. **Marine Sciences**，2011，35(1)：17-21.(in Chinese)

[19] Hayashi S，Suzuki M Nakamura. Steady-state kinetics and spectral properties of *Corynebacterium sarcosine* oxidase[J]. **Biochimia et Biophysica Acta(BBA)–Protein Structure and Molecular Enzymology**，1983，742(3)：630-636.

[20] Brown M，Royer C. Fluorescence spectroscopy as a tool to investigate protein interactions [J]. **Current Opinion in Biotechnology**，1997，8(1)：45-49.

[21] 陈亦，辛瑜，杨海麟，等. 保护剂对胆固醇氧化酶稳定性机理的研究[J]. 食品与生物技术学报，2013，32(6)：661-666.
CHEN Yi，XIN Yu，YANG Hailin，et al. Study on the effect of protective additives on stability mechanism of cholesterol oxidase [J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**，2013，32(6)：661-666.(in Chinese)

[22] 郝淑美，王宣军，张秀霞. 用乳糖作为诱导剂进行重组蛋白的表达[J]. 中国生物制品学杂志，2005，18(5)：409-411.
HAO Shumei，WANG Xuanjun，ZHANG Xiuxia. Expression of recombinant gene in *E. coli* using lactose as inducer[J]. **Chinese Journal of Biologicals**，2005，18(5)：409-412.(in Chinese)

[23] 沈琼，黄滨，邵嘉亮，等. 运用圆二色谱研究酶与化合物相互作用的机理[J]. 中山大学学报，2006，45(4)：62-64.
SHEN Qiong，HUANG Bin，SHAO Jialiang，et al. Mechanism discussion of interaction between enzyme and several compounds with circular dichroism method[J]. **Journal of Zhongshan University**，2006，45(4)：62-64.(in Chinese)