

## 重组猪羧肽酶B的酶学性质及稳定性研究

吴珊, 李素霞\*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海200237)

**摘要:** 目的 研究重组猪羧肽酶B的酶学性质及稳定性。方法 测定其酶学动力学参数 $K_m$ 和 $V_{max}$ , 最适pH和最适温度; 研究不同pH和不同温度条件下酶的稳定性, 以及金属离子和EDTA对酶的活性与稳定性的影响。结果 重组猪羧肽酶B的 $K_m$ 为0.27 mmol/L,  $V_{max}$ 为222.22  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , 最适pH为7.65, 最适催化温度为25  $^{\circ}\text{C}$ ; pH在5.0~9.0范围内, 温度在4~30  $^{\circ}\text{C}$ 稳定性良好,  $\text{Cu}^{2+}$ 和EDTA抑制酶活性,  $\text{Co}^{2+}$ 促进酶活性。结论 重组猪羧肽酶B的酶学性质与报道的提取猪羧肽酶B的性质基本相同, pH5.0~9.0范围内稳定, 在4~30  $^{\circ}\text{C}$ 时稳定性好。

**关键词:** 重组猪羧肽酶B; 酶学性质; 稳定性

中图分类号: Q555

文献标识码: A

文章编号: 1672-979X(2012)05-0159-04

### Study on Property and Stability of Recombinant Porcine Carboxypeptidase B in *E. coli*

WU Shan, LI Su-xia

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract: Objective** To research the enzymatic property and stability of recombinant porcine pancreatic carboxypeptidase B (CPB). **Methods** The kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$ , optimum pH and temperature were measured; the effects of pH and temperature on stability of CPB were studied, the effects of different metal ions and EDTA on activity and stability of CPB were also investigated. **Results** The  $K_m$  and  $V_{max}$  measured were 0.27 mmol/L and 222.22  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , respectively. The optimum pH was 7.65, the optimum catalytic temperature was 25  $^{\circ}\text{C}$ . CPB was stable when pH was between 5.0 and 9.0 or temperature was lower than 30  $^{\circ}\text{C}$ .  $\text{Cu}^{2+}$  and EDTA inhibited the activity of CPB while  $\text{Co}^{2+}$  promoted it. **Conclusion** The enzymatic property of recombinant porcine CPB can be similar to the native porcine CPB. Recombinant porcine CPB can be relatively stable at pH 5.0~9.0, and it has a very good stability at 4~30  $^{\circ}\text{C}$ .

**Key Words:** recombinant porcine carboxypeptidase B; enzymatic property; stability

羧肽酶B (CPB) (EC3.4.17.2) 是一种金属酶, 每分子羧肽酶B含有一个锌原子, 羧肽酶B能选择性地水解蛋白或多肽C端的精氨酸和赖氨酸<sup>[1]</sup>。羧肽酶原B (proCPB) 的N端有一段 $11 \times 10^3$ 的前导肽, 覆盖了酶的活性位点, 胰蛋白酶切除前导肽后, 才能生成有活性的羧肽酶B<sup>[2]</sup>。羧肽酶B能用于蛋白质和多肽测序以及胰腺炎的诊断<sup>[3]</sup>, 在胰岛素原转化为胰岛素的过程中也发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。羧肽酶B的传统工业制备方法是从猪或牛的胰腺中提取<sup>[5]</sup>, 由于含量低导致提取成本高并且提取的酶中可能混有其它蛋白酶, 且有污染病毒的可能性, 而采用基因工程的方法生产

该重组蛋白既降低成本, 又减少污染。本实验室在重组大肠杆菌中已成功表达了鼠源羧肽酶原B, 并最终得到了高比活的羧肽酶B<sup>[6]</sup>。本文主要研究重组猪羧肽酶B的酶学性质和稳定性。

### 1 材料

#### 1.1 培养基

LB培养基: 1%胰蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1%NaCl。

#### 1.2 试剂

马尿酸-L-精氨酸 (Sigma-Aldrich), 其余试剂均为分析纯。

收稿日期: 2011-09-28

作者简介: 吴珊 (1987-), 女, 硕士研究生, 生物化学与分子生物学专业 E-mail: coral53@163.com

\*通讯作者: 李素霞, E-mail: lisuxia@ecust.edu.cn, Tel: 021-64252255

### 1.3 高纯度的重组猪羧肽酶B

由本实验室制备。

## 2 方法

### 2.1 酶活性与蛋白质浓度的测定

根据Folk and Schirmer<sup>[7]</sup>法测定重组猪羧肽酶B的活性。以马尿酸-L-精氨酸为底物，以25℃下每1 min水解1 μmol底物所需的酶量定义为1个酶活性单位(U)，比活单位为U/mg。蛋白质浓度测定采用Bradford法<sup>[8]</sup>，以牛血清白蛋白为标准蛋白。

### 2.2 重组猪羧肽酶B的酶学性质

**2.2.1 动力学参数测定** 用不同浓度的马尿酸-L-精氨酸(0.05~0.30 mmol/L)为底物测酶活性，然后根据米氏方程 $V=V_{\max} \times [S]/(K_m+[S])$ ，用双倒数法作图。即以酶促反应的倒数 $1/V$ 对底物浓度的倒数 $1/[S]$ 作一直线，根据其斜率及截距求 $K_m$ 及 $V_{\max}$ ，在标准条件下测定酶活性。

**2.2.2 最适pH** 将马尿酸-L-精氨酸溶解于25 mmol/L、pH 3.0~12.0的不同缓冲液中，于25℃分别用来测定重组猪羧肽酶B的活性。缓冲液的配制如下：醋酸-醋酸钠缓冲液(pH3.0~5.0)， $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH6.0~7.5)，Tris-HCl缓冲液(pH8.0~9.0)，Gly-NaOH缓冲液(pH9.0~12.0)，缓冲液均在25℃配制。以pH7.65的马尿酸-L-精氨酸溶液所测酶活性为100%，计算相对酶活性。

**2.2.3 最适反应温度** 分别用4, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80℃马尿酸-L-精氨酸溶液测定重组猪羧肽酶B活性，以时间为横坐标、 $A_{254}$ 为纵坐标作图。

### 2.3 重组猪羧肽酶B的稳定性

**2.3.1 pH稳定性** 将重组猪羧肽酶B稀释至pH 3.0~12.0缓冲液中(缓冲液的配制同上)，酶液终浓度为0.3 mg/mL。25℃水浴12 h，分别取样测酶活性。以水浴前的酶活性为100%，计算残余酶活性。

**2.3.2 温度稳定性** 将浓度0.3 mg/mL重组猪羧肽酶B分别置于4, 25, 30, 40, 50, 60℃恒温水浴，水浴时间为0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 20 h时取样测酶活性。以水浴前的酶活性为100%，计算残余酶活性。

**2.3.3 金属离子与EDTA对酶活性的影响** 采用的金属离子有 $\text{Fe}^{3+}$ ， $\text{Co}^{2+}$ ， $\text{Cu}^{2+}$ ， $\text{Ba}^{2+}$ ， $\text{Ni}^{2+}$ ， $\text{Mg}^{2+}$ ， $\text{Ca}^{2+}$ ， $\text{Mn}^{2+}$ ， $\text{Zn}^{2+}$ ，加入酶液的终浓度均为1 mmol/L，EDTA设置两个终浓度，为1 mmol/L与10 mmol/L，

酶液终浓度为0.3 mg/mL。将金属离子或EDTA、酶液和缓冲液混合均匀后在25℃保温2 h，测酶活性。以不加金属离子和EDTA的空白对照2 h后的活性为100%，计算残余酶活性。

## 3 结果与分析

### 3.1 重组猪羧肽酶B的酶学性质

**3.1.1 动力学参数测定** 用以研究酶学性质与稳定性的重组猪羧肽酶B样品的电泳结果，见图1。采用双倒数法作图，根据斜率与截距计算动力学参数，结果为： $K_m$ 值为0.27 mmol/L， $V_{\max}$ 为222.22 μmol/min。

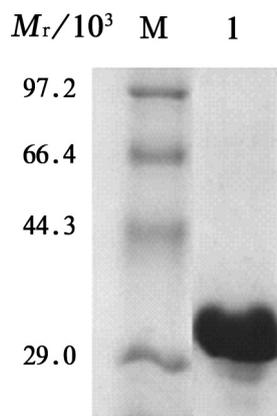


图1 重组猪羧肽酶B的SDS-PAGE

M. 蛋白质分子质量Marker; 1. CPB

**3.1.2 最适pH** 重组猪羧肽酶B的最适pH为7.65，见图2。pH低于7.65时相对活性迅速降低，pH为7.0时只有30%的相对活性，pH降至5.0时，已基本没有活性。相比于酸性条件，在碱性条件下相对酶活性下降缓慢，pH为9.0时还有60%的相对活性，在pH11.0时还有20%以上的相对活性，pH为12.0时酶活性基本丧失。

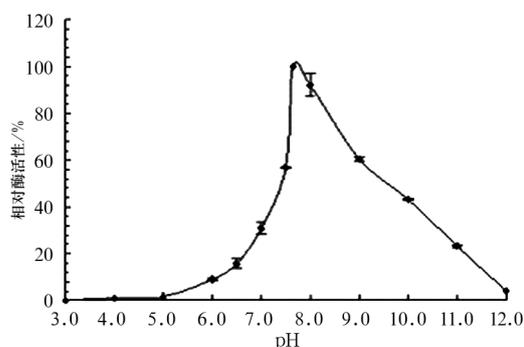


图2 重组猪羧肽酶B的最适pH

**3.1.3 最适反应温度** 在不同温度下测活性， $A_{254}$ 随着时间的变化见图3。在3 min的测活性时间内，25℃下的

催化速度最为稳定。随着温度升高,酶的催化速度随之提高,但是不稳定。如果测活性温度过高,随着催化时间延长,酶活性将因蛋白质变性而逐渐下降。

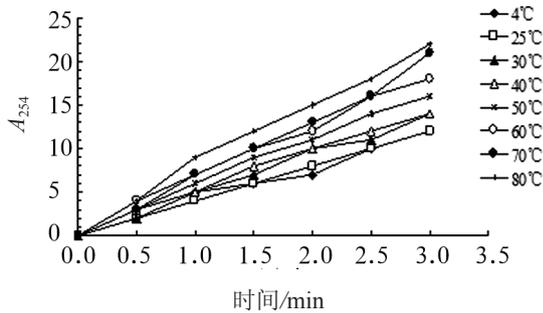


图3 重组猪羧肽酶B最适反应温度

### 3.2 重组猪羧肽酶B的稳定性

**3.2.1 pH稳定性** 重组猪羧肽酶B在不同pH下的稳定性见图4。其pH稳定范围比较广,在5.0 < pH < 9.0的范围内都较稳定,在25 °C水浴12 h后还有90%以上的残余酶活性。在酸性条件下, pH为4.0时还有近40%的残余酶活性,至pH为3.0时活性基本丧失。在碱性条件下, pH为11.0时仍有40%以上的残余酶活性, pH为12.0时基本丧失活性。

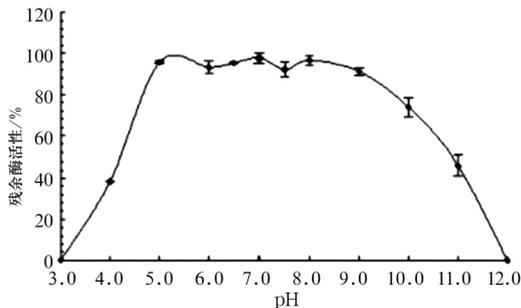


图4 重组猪羧肽酶B的pH稳定性

**3.2.2 温度稳定性** 重组猪羧肽酶B在不同温度下的稳定情况见图5。其在4~30 °C稳定,水浴20 h后,活性基本无降低。40 °C条件下CPB也较稳定,水浴保温20 h后酶活性下降不超过8%。50 °C时,随着水浴时间延长,酶活性下降比较明显,2 h后还有接近90%的酶活性,而8 h后酶活性降到50%,20 h后酶活性丧失到原来的20%以下。60 °C高温下酶活性下降迅速,15 min后活性即下降30%,半小时后还剩一半酶活性,水浴过程中有许多聚集物生成,应为变性的酶蛋白,2 h后活性基本丧失。

**3.2.3 金属离子和EDTA对酶活性的影响** 金属离子和EDTA对重组猪羧肽酶B的影响见图6。Co<sup>2+</sup>能大幅提

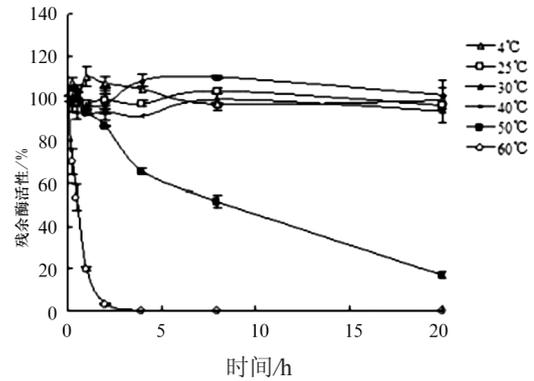


图5 重组猪羧肽酶B的温度稳定性

高CPB活性,而Cu<sup>2+</sup>则能抑制其活性,其他金属离子对酶活性的影响不大。EDTA能抑制其活性,因为EDTA作为络合剂能够络合其活性中心的Zn<sup>2+</sup>, EDTA的浓度越高,抑制酶活性的作用越强。

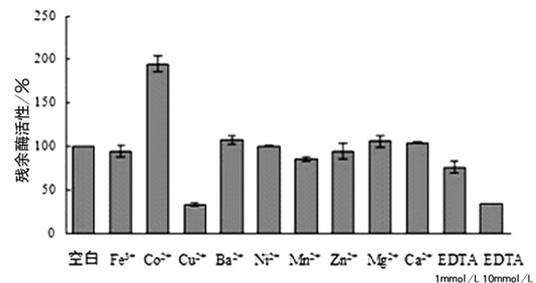


图6 金属离子和EDTA对酶活性的影响

## 4 讨论

$K_m$ 值可以反映酶与底物的亲和力大小,  $K_m$ 值越小,酶与底物的亲和力越大,以马脲酰-L-精氨酸为底物,重组猪羧肽酶B的 $K_m$ 值为0.27 mmol/L,表明重组猪羧肽酶B与底物的亲和性较好。最适pH为7.65,最适反应温度为25 °C,这与重组鼠羧肽酶B基本类似。而且该酶的稳定性很好,在5.0 < pH < 9.0的范围内较稳定,室温放置12 h,仍有90%以上的残余酶活性;在低于30 °C的温度水浴20 h后活性基本没有变化,即便在40 °C放置20 h,也只损失了不超过8%的活性,50 °C以上活性下降明显。除了Cu<sup>2+</sup>外,酶活性受金属离子的影响较小,Co<sup>2+</sup>能提高其活性,这与提取的猪羧肽酶B和重组鼠羧肽酶B很相似<sup>[7-8]</sup>。络合剂EDTA能抑制其活性,也说明了其具有金属酶的特点。

## 参考文献

- [1] Hideki K, Kenji H. Isolation and characteristics of carboxypeptidase B from the pyloric ceca of the starfish *Asterias amurensis*[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2002, 133(2): 183-189.

## 山香圆叶化学成分研究

孙敬勇<sup>1</sup>, 孙洁<sup>2</sup>, 武海艳<sup>1</sup>, 刘珂<sup>3</sup>

(1. 山东省医学科学院药物研究所 山东省罕见病重点实验室, 山东 济南 250062; 2. 山东省济南市天桥人民医院, 山东 济南 250031; 3. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

**摘要:** 目的 研究山香圆叶的化学成分。方法 采用色谱技术进行分离、纯化, 通过理化常数和波谱分析鉴定化合物结构。结果 从山香圆叶中分离出10个化合物, 分别为芹菜素(1), 芹菜素7-O-β-D-葡萄糖苷(2), 芹菜素7-新橙皮糖苷(3), 芹菜素-7-(2'-α-L-鼠李糖基)芸香糖苷(4), 对羟基桂皮酸(5), 没食子酸乙酯(6), 没食子酸(7), eucomic acid(8), β-谷甾醇(9), 胡萝卜苷(10)。结论 化合物4~6, 8, 9为首次从该属植物中分离得到。

**关键词:** 山香圆叶; 化学成分; 结构鉴定

中图分类号: S576.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-979X (2012) 05-0162-04

### Studies on the Chemical Constituents of *Turpiniae Folium*

SUN Jing-yong<sup>1</sup>, SUN Jie<sup>2</sup>, WU Hai-yan<sup>1</sup>, LIU Ke<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Rare and Uncommon Diseases, Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China; 2. Jinan Tianqiao Hospital, Jinan 250031, China; 3. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

**Abstract:** **Objective** To study the chemical constituents of *Turpiniae Folium*. **Methods** The compounds were isolated and purified by column chromatography and their structures were identified on the basis of physicochemical properties and spectral analyses. **Results** Ten compounds were isolated and their structures were identified as apigenin(1), apigenin 7-O-β-D-glucoside(2), apigenin 7-neohesperidoside(3), apigenin 7-(2'-rhamnosyl) rotinoside(4), p-hydroxycinnamic acid(5), galic acid ethyl ester(6), galic acid(7), eucomic acid(8), β-sitosterol(9), daucosterol(10). **Conclusion** The compounds 4~6, 8, 9 were isolated and identified from this genus for the first time.

**Key Words:** *Turpiniae Folium*; chemical constituents; structure identification

山香圆(*Turpinia arguta* Seem)为省沽油科山香圆属植物, 性味辛、温, 盛产于江西省赣南地区。民间用鲜叶水煎内服治疗扁桃体炎、咽喉炎, 预防感冒, 或鲜叶捣烂外敷治疗疮疥, 均有显著疗效<sup>[1]</sup>。单味药

材制剂山香圆含片具有清热解毒、利咽消肿的功效, 用于治疗咽喉炎、扁桃体炎<sup>[2]</sup>。该属作为药用的主要有山香圆(*Turpinia arguta* Seem.)等。

山香圆叶(*Turpiniae Folium*)作为中国药典2010

收稿日期: 2011-10-15

作者简介: 孙敬勇(1970-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事天然药物研究, Tel: 0531-82919963

E-mail: sunjingyong@tom.com

- [2] Burgos F J, Salva M, Villegas V, et al. Analysis of the activation process of porcine pro-carboxypeptidase B and determination of the sequence of its activation segment[J]. *Biochemistry*, 1991,30:4082-4089.
- [3] 李素霞, 张晓彦, 张映新, 等. 羧肽酶B研究进展[J]. *药物生物技术*, 2006, 13(4): 302-305.
- [4] Jonasson P, Nilsson J, Samuelsson E, et al. Single-step trypsin cleavage of a fusion protein to obtain human insulin and its C peptide[J]. *Eur J Biochem*, 1996,236:656-661.
- [5] Folk J E, Gladner J A. Carboxypeptidase B:I.Purification of the zymogen and specificity of the enzyme[J]. *J Biol Chem*, 1958,231:379-391.
- [6] Li S X, Zhang Y J, Tian L P, et al. Cloning and expression of a new procarboxypeptidase B gene in *Escherichia coli* and purification of recombination carboxypeptidase B[J]. *Protein Pept Lett*, 2003, 10(6): 581-590.
- [7] Folk J E, Piez K A, Carroll W R, et al. Carboxypeptidase B:IV. purification and characterization of the porcine enzyme[J]. *J Biol Chem*, 1960,235(2):2272-2277.
- [8] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976,72(2): 248-254.