

N-糖基化对植酸酶 phy(Q_F) 酶学性质的影响

王 茜¹, 宋玛丽¹, 杜 军¹, 付月君¹, 胡风云², 梁爱华¹

(1. 山西大学 生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006;

2. 山西省人民医院 神经内科, 山西 太原 030012)

摘要:为探讨 N-糖基化对植酸酶 phy(Q_F) 酶学性质的影响, 将植酸酶基因 phy(Q_F) 在毕赤酵母中进行了表达, 利用脱糖基化酶 Endo H_f 去除重组植酸酶 phy(Q_F) 的糖链, 对去除糖链前后的植酸酶 phy(Q_F) 进行了纯化和酶学性质研究与比较。结果表明, 糖基化的植酸酶 phy(Q_F) 分子量约为 53 kDa, 酶活为 3 201 U/mg, $K_m = 392 \mu\text{mol/L}$, $V_{\max} = 3 267 \text{ U/mg}$; 糖基化的植酸酶 phy(Q_F) 最适 pH 值为 4.5, 最适反应温度为 55 °C, 与去糖基化的植酸酶 phy(Q_F) 的最适 pH 值无明显区别, 比去糖基化的植酸酶 phy(Q_F) 最适温度提高了 5 °C, T_m 值提高约 2 °C。经 70 °C 孵育 10 min 后, 去糖基化的植酸酶 phy(Q_F) 完全失活, 而糖基化的植酸酶 phy(Q_F) 仍残留 13% 的活性, 说明 N-糖基化作为一种重要的翻译后修饰, 对植酸酶 phy(Q_F) 的稳定性有促进作用。

关键词:植酸酶; N-糖基化; 毕赤酵母; 热稳定性; 圆二色谱

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2015)01-0177-05

doi: 10.7668/hbxb.2015.01.030

The Effects of N-glycosylation on Enzymological Properties of Phytase Phy(Q_F)

WANG Xi¹, SONG Ma-li¹, DU Jun¹, FU Yue-jun¹, HU Feng-yun², LIANG Ai-hua¹

(1. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Department of Neurology, Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030012, China)

Abstract: In order to study the effects of N-glycosylation on enzymological properties of phytase phy(Q_F), the recombinant phytase gene phy(Q_F) was expressed in *pichia pastoris* GS115. Phytase phy(Q_F) was deglycosylated by endoglycosylase Endo H_f. Enzymology properties of glycosylated phy(Q_F) and deglycosylated phy(Q_F) were analyzed. The results showed that the glycosylated phy(Q_F) had a specific activity of 3 201 U/mg with an MW of approximately 53 kDa and the K_m and V_{\max} of glycosylated phy(Q_F) were 392 $\mu\text{mol/L}$ and 3 267 U/mg, respectively. The optimal pH value of glycosylated phy(Q_F) was 4.5 and was consistent with that of deglycosylated phy(Q_F). However, the optimal temperature of glycosylated phy(Q_F) was 55 °C, 5 °C higher than that of deglycosylated phy(Q_F) and 2 °C increased in the melting temperature (T_m). The glycosylated phy(Q_F) exhibited 13% residual activity after treatment at 70 °C for 10 min and deglycosylated phy(Q_F) was completely deactivated under the condition. As one of posttranslational modifications, N-glycosylation may play an important role in improving the stability of phytase phy(Q_F).

Key words: Phytase; N-glycosylation; *Pichia pastoris*; Thermal stability; Circular dichroism

植酸酶 (Myoinositol hexakisphosphate phosphohydrotase) 能将植酸及其盐降解为肌醇和磷酸 (或磷酸盐), 其作为饲料添加剂既可帮助单胃动物降解植酸, 又可以减少由植酸引起的副作用, 这已得到了

广泛的应用^[1-6]。

真核蛋白表达翻译后加工修饰对蛋白结构功能具有重要的作用, 当蛋白质含有一致性序列 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) (X 代表任何氨基酸) 时, 毕赤酵

收稿日期: 2014-12-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31372199; 31272100); 国家高技术研究发展计划“863”计划项目 (2012AA020809); 山西省回国留学人员科研资助项目 (2012-重点 1)

作者简介: 王 茜 (1989-), 女, 山西临汾人, 在读硕士, 主要从事分子生物学研究。

通讯作者: 梁爱华 (1957-), 女, 山西榆社人, 教授, 博士, 主要从事分子生物学研究。

母能对天冬氨酰残基上的酰胺氮进行糖基化,产生 N-糖基化。毕赤酵母表达植酸酶翻译后修饰主要是 N-糖基化修饰,而且糖基化对植酸酶的热稳定性有促进作用^[7-9];但也有文献报道^[10],有些糖基化反而会降低植酸酶的热稳定性。

山西大学生物技术研究所姚明泽前期获得了一个植酸酶基因 *phy*(Q_F), 由该基因编码的氨基酸序列上有 3 个潜在的 N-糖基化位点。为了探讨糖基化对该植酸酶性质的影响,本研究首先将该基因在毕赤酵母中进行了表达,在获得了糖基化的植酸酶 *phy*(Q_F)后,利用脱糖基化酶 Endo H_f 去除植酸酶 *phy*(Q_F)的糖链,对去除糖基化前后的植酸酶 *phy*(Q_F)进行了纯化和酶学性质研究与比较,旨在探讨 N-糖基化对植酸酶 *phy*(Q_F)酶学性质的影响,为植酸酶的定向改造提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli* DH5 α)、毕赤酵母 (*Pichia pastoris* GS115)、酵母工程菌 *phy*(Q_F)均由山西大学生物技术研究所梁爱华教授课题组保存。

1.1.2 试剂 YNB、YPD 购于 Solabio 公司;植酸钠 P1090 购于 Sigma 公司;其余试剂均购于上海生工公司。YPD、BMGY、BMMY 等培养基均按照 Invitrogen 公司提供的毕赤酵母操作手册进行配制。Bradford 蛋白定量测定试剂盒购于 Fermentas 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 重组植酸酶 *phy*(Q_F)的表达纯化及去糖基化 毕赤酵母的培养及诱导按照 Invitrogen 公司酵母表达操作流程说明书进行。诱导培养液经 80% 硫酸铵沉淀、阳离子交换层析 (SP Sepharose TM Fast Flow) 及分子筛凝胶层析 (Hiprep 26/10) 进一步纯化。植酸酶去糖基化处理采用 New England Biolabs 公司的脱糖基化酶 Endo H_f 。利用 SDS-PAGE 分析去糖基化前后的植酸酶 *phy*(Q_F)。

1.2.2 植酸酶活力测定 植酸酶活性测定采用钼蓝法。在 37 °C 下每分钟释放 1 μ mol/L 无机磷所需的酶含量^[11-12]为一个酶活力单位。

1.2.3 去糖基化前后植酸酶 *phy*(Q_F)的性质比较

最适酶促反应 pH 值:酶分别在 pH 值为 1.0 ~ 3.5 的 250 mmol/L Glycine-HCl; pH 值为 4.0 ~ 6.0 的 250 mmol/L NaAc-HAc; pH 值为 6.5 ~ 7.0 的 250 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中 37 °C 保温 1 h 后,在标准条件下测定酶活力,确定酶的最适 pH 值。

最适温度:在最适 pH 值条件下,分别在 30 ~ 70 °C 的条件下反应 15 min,测定相对酶活力,确定酶促反应的最适温度。

耐热性和热稳定性:将蛋白样品分别在 40 ~ 75 °C 的恒温水浴中处理 10 min 后,冰浴 30 min,在标准条件下测定残余酶活力,确定酶的耐热范围;在 65 °C 的恒温水浴中分别处理 2, 4, 6, 8, 10 min 后,冰浴 30 min,在标准条件下测定残余酶活力,比较酶的热稳定性。

动力学常数 K_m 和 V_{max} :在最适条件下,让酶促反应分别在 1 ~ 15 min 的时间段进行,测定酶活力;利用 Line weaver-Burk 曲线测定蛋白样品的动力学常数 K_m 和 V_{max} ^[12]。

溶解温度 (T_m) 的测定:蛋白样品浓度为 2×10^{-7} mol/L。以 280 nm 为荧光激发波长,发射波长扫描范围为 300 ~ 450 nm。温度范围为 10 ~ 95 °C,狭缝为 5 nm。溶解温度 (T_m) 由公式 $Y =$

$$\frac{y_N + y_D \times \exp\left(\frac{\Delta H_m}{RT} \times \frac{T - T_m}{T_m}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_m}{RT} \times \frac{T - T_m}{T_m}\right)} \text{ 计算得出}^{[13-14]}。$$

圆二色谱:圆二色 (Circular dichroism, CD) 光谱是研究稀溶液中蛋白质构象的一种简单、快速、较准确的方法。本研究使用的蛋白样品浓度为 2×10^{-5} mol/L。扫描范围为 200 ~ 250 nm。比色杯选用 1 cm 光程的石英比色杯,电压低于 600 V,扫描速度为 20 nm/min,响应时间为 1 s。同一样品扫描 3 次,取平均值,CD 图像由 Origin 8.0 完成。

2 结果与分析

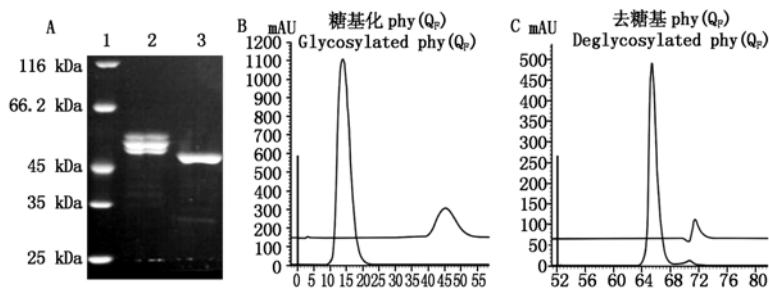
2.1 重组植酸酶的表达纯化及去糖基化

SDS-PAGE 结果 (图 1) 表明,植酸酶 *phy*(Q_F) 在毕赤酵母 GS115 中成功表达,纯化后蛋白纯度达到 90% 以上;植酸酶 *phy*(Q_F) 的相对分子量约为 53 kDa (图 1-A 的泳道 2), *phy*(Q_F) 上存在 3 个 N-糖基化位点,表达的蛋白分子量由于糖基化程度不同而存在差异,呈现多条带型。植酸酶 *phy*(Q_F) 的含糖量约为 12.8% 而经脱糖基化酶 Endo H_f 处理去除糖链后, *phy*(Q_F) 的分子量为 47 kDa, 并且为一条带 (图 1-A 的泳道 3), 表明糖链去除完全。

2.2 酶学性质的分析与比较

2.2.1 最适 pH 值和最适温度的确定 分别对糖基化的植酸酶 *phy*(Q_F) 与去糖基化的植酸酶 *phy*(Q_F) 的最适 pH 值和最适温度进行了测定与比较,结果表明,二者的最适 pH 值都为 4.5 (图 2-A)。去糖

基化的植酸酶 phy (Q_F) 的最适温度为 50 ℃, 而糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 的最适温度提高了 5 ℃ (图 2-

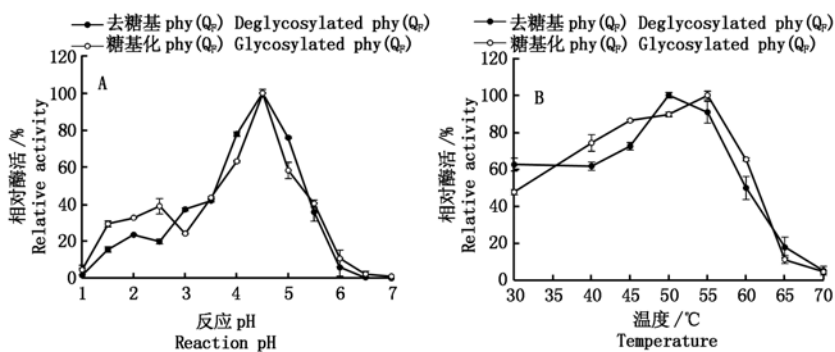


A. 植酸酶 phy (Q_F) 去糖基化前后的 SDS-PAGE 图; 泳道 1. 低分子量标准蛋白; 泳道 2. 纯化后的植酸酶 phy (Q_F); 泳道 3. 去糖基化后的植酸酶 phy (Q_F); B. 糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 经凝胶柱纯化的洗脱图; C. 去糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 经凝胶柱纯化的洗脱图。

A. SDS-PAGE of purified glycosylated phy (Q_F) and deglycosylated phy (Q_F); Lane 1. Protein molecular mass standards; Lane 2. Purified phy (Q_F); Lane 3. Deglycosylated phy (Q_F) by Endo H₁. B. Gel filtration chromatography of glycosylated phy (Q_F); C. Gel filtration chromatography of deglycosylated phy (Q_F).

图 1 植酸酶 phy (Q_F) 的表达纯化及去糖基化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified glycosylated phy (Q_F) and deglycosylated phy (Q_F)



A. 糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 与去糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 的最适 pH 值;

B. 糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 与去糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 的最适温度。

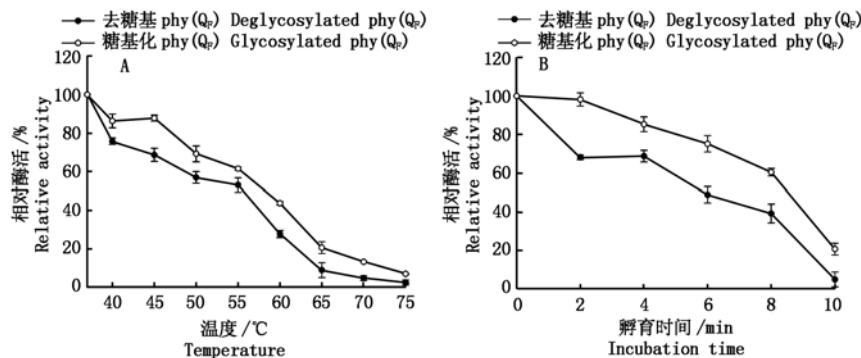
A. Optimal pH of glycosylated phy (Q_F) and deglycosylated phy (Q_F); B. Optimal temperature of glycosylated phy (Q_F) and deglycosylated phy (Q_F).

图 2 去糖基化前后植酸酶 phy (Q_F) 的最适 pH 值和最适温度

Fig. 2 Optimal pH and Optimal temperature of glycosylated phy (Q_F) and deglycosylated phy (Q_F)

2.2.2 糖基化对植酸酶温度稳定性的影响 将糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 与去糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 分别在 40 ~ 70 ℃ 温度下孵育 10 min, 标准条件下测定酶活, 结果表明, 糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 在 55 ~ 60 ℃ 处理 10 min 后, 残余活性达 40% 以上;

75 ℃ 时, 糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 的残余活性为 13%, 而去糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 几乎测不到活性 (图 3-A)。65 ℃ 处理不同时间, 糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 处理 10 min 后仍有 21% 的残余活性, 而去糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 的残余活性低于 4% (图 3-B)。



A. 糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 与去糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 的耐热性; B. 糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 与去糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 的热稳定性。

A. The thermostability of glycosylated phy (Q_F) and deglycosylated phy (Q_F); B. The thermal tolerance of glycosylated phy (Q_F) and deglycosylated phy (Q_F).

图 3 温度对糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 和去糖基化的植酸酶 phy (Q_F) 的影响

Fig. 3 Effects of temperature on glycosylated phy (Q_F) and deglycosylated phy (Q_F)

以上结果说明,与去糖基化的植酸酶 phy(Q_F)相比,糖基化的植酸酶 phy(Q_F)有更好的热稳定性及耐热性;糖基化的植酸酶 phy(Q_F)的溶解温度($T_m = 56\text{ }^{\circ}\text{C}$)比去糖基化的植酸酶 phy(Q_F)($T_m = 54\text{ }^{\circ}\text{C}$)提高了 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.3 动力学参数及酶活 利用 Line weaver-Burk 曲线测定糖基化的植酸酶 phy(Q_F)与去糖基化的植酸酶 phy(Q_F)的 K_m 分别为 $392, 169\text{ }\mu\text{mol/L}$, V_{\max} 分别为 $3\ 267, 3\ 376\text{ U/mg}$;在最适条件下,糖基化的植酸酶 phy(Q_F)的比活为 $3\ 201\text{ U/mg}$,去糖基化的植酸酶 phy(Q_F)的比活为 $3\ 257\text{ U/mg}$ 。

2.2.4 圆二色谱 为研究糖基化对酶构象的影响,对糖基化的植酸酶 phy(Q_F)与去糖基化的植酸酶 phy(Q_F)进行了 CD 光谱检测,结果显示,去除糖基化后,植酸酶 phy(Q_F)的二级结构发生了变化, α -螺旋结构明显减少,表明糖基化对于维持植酸酶 phy(Q_F)的正确构象起到了重要的作用(图 4)。

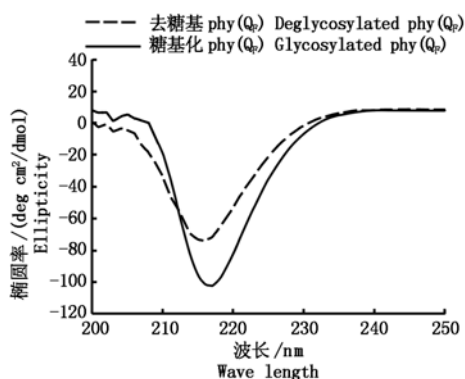


图 4 糖基化的植酸酶 phy(Q_F)与去糖基化的植酸酶 phy(Q_F)的圆二色谱

Fig. 4 Circular dichroism spectroscopy of glycosylated phy(Q_F) and deglycosylated phy(Q_F)

3 讨论

N-糖基化是真核生物蛋白质最重要的翻译后修饰之一,植酸酶在毕赤酵母中表达经 N-糖基化修饰,对植酸酶的热稳定性有促进作用^[15]。糖基化可增加蛋白质对于各种变性条件(如变性剂、热等)的稳定性^[16],防止蛋白质的相互聚集^[17]。同时,蛋白质表面的糖链还可覆盖蛋白质分子中的某些蛋白酶降解位点,从而增加蛋白质对于蛋白酶的抗性^[18]。不同的植酸酶糖基化程度不同,如曲霉植酸酶 *Aspergillus niger* NRRL 3135 含糖量为 35.3% ^[19];无花果植酸酶约含有 27.3% 糖基^[20],我们对植酸酶 phy(Q_F)的含糖量也进行了估算,结果约为 12.8% 。

植酸酶 phy(Q_F)序列中含有 3 个糖基化位点,分别位于 NVT139-141、NVS204-206 和 NWT317-319

上。通过 SDS-PAGE 检测,结果表明,3 个糖基化位点都已被毕赤酵母正确识别,形成糖蛋白。本研究利用高碘酸希尔法^[21]检测糖蛋白,结果表明,图 1-A 的 2 泳道中的 3 条带均为糖蛋白。在去除糖链的试验中,对脱糖基化酶 Endo H_f 和植酸酶的比例进行了优化,通过优化可用最少量的脱糖基化酶使植酸酶的糖链完全去除。当利用脱糖基化酶 Endo H_f 去除糖链后,植酸酶 phy(Q_F)的热稳定性下降,可能是由于糖基化使酶分子侧链构象更加稳定。因此,这 3 个糖基化位点可使植酸酶 phy(Q_F)更稳定,在改善植酸酶 phy(Q_F)酶学性质方面起着重要的作用。

参考文献:

- [1] Khajal F, Slominsk B A. Factors that affect the nutritive value of canola meal for poultry [J]. Poultry Science 2012, 91(10): 2564–2575.
- [2] Yao M Z, Zhang Y H, Lu W L, et al. Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications [J]. J Appl Microbiol, 2012, 112(1): 1–14.
- [3] Tahir M, Shim M Y, Ward N E, et al. Phytate and other nutrient components of feed ingredients for poultry [J]. 2012, 91(4): 928–935.
- [4] 王芳, 张红岗, 李燕萍. 植酸酶在鹌鹑 EI 粮中的应用 [J]. 山西农业科学, 2003, 31(1): 58–60.
- [5] 王郡美, 宋维平, 张莉. 宇佐美曲霉植酸酶 phyA 基因的克隆 [J]. 华北农学报, 2006, 21(3): 5–8.
- [6] 柯晓静, 郭润芳, 于宏伟, 等. 植酸酶基因 *PhyB₁* 的克隆及序列分析 [J]. 华北农学报, 2007, 22(2): 14–17.
- [7] Han Y, Lei X G. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris* [J]. Arch Biochem Biophys, 1999, 364(1): 83–90.
- [8] Kim Y O, Kim H W, Lee J H, et al. Molecular cloning of the phytase gene from *Citrobacter braakii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(1): 33–38.
- [9] Zou L K, Wang H N, Pan X, et al. Design and expression of a synthetic phyC gene encoding the neutral phytase in *Pichia pastoris* [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2006, 38(11): 803–811.
- [10] Rodriguez E, Wood Z A, Karplus P A, et al. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris* [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 382(1): 105–112.
- [11] 张耀华, 姚明泽, 卢文亮, 等. 大肠杆菌植酸酶在毕赤酵母中的表达与纯化 [J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(4): 678–681.

- [12] 王 茜, 卢文亮, 姚明泽, 等. 芽孢杆菌植酸酶 phy (ycD) 基因在大肠杆菌中的异源表达与纯化[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(2): 295 – 299.
- [13] Pace C N, Hebert E J, Shaw K L, *et al.* Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3 [J]. J Mol Biol, 1998, 279(1): 271 – 286.
- [14] Correia A R, Adinolfi S, Pastore A, *et al.* Conformational stability of human frataxin and effect of Friedreich's ataxia-related mutations on protein folding [J]. Biochem J, 2006, 398(3): 605 – 611.
- [15] Yao M Z, Wang X, Wang W, *et al.* Improving the thermostability of *Escherichia coli* phytase, AppA, by enhancement of glycosylation [J]. Biotechnol Lett, 2013, 35(10): 1669 – 1676.
- [16] Kwon K S, Yu M H. Effect of glycosylation on the stability of alpha1-antitrypsin toward urea denaturation and thermal deactivation [J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1335(3): 265 – 272.
- [17] Suzuki S, Furuhashi M. Additional N-glycosylation at Asn(13) rescues the human LH beta-subunit from disulfide-linked aggregation [J]. Mol Cell Endocrinol, 2000, 160(1–2): 157 – 163.
- [18] 赵洪亮, 刘志敏. 蛋白质糖基化工程 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 9(23): 18 – 20.
- [19] Panchal T, Wodzinski R J. Comparison of glycosylation patterns of phytase from *Aspergillus niger* (A. ficuum) NRRL 3135 and recombinant phytase [J]. Prep Biochem Biotechnol, 1998, 28(3): 201 – 217.
- [20] 潘冬梅, 李弘剑, 李白桦, 等. 无花果曲霉植酸酶发酵及酶动力学 [J]. 暨南大学学报, 2001, 22(5): 107 – 112.
- [21] 王玉琪, 巫光宏, 林先丰, 等. 多糖和糖蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳染色方法的改进 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(2): 169 – 172.