



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111363731 A

(43)申请公布日 2020.07.03

(21)申请号 202010307532.5

(22)申请日 2020.04.17

(71)申请人 马金佑

地址 517400 广东省河源市紫金县敬梓镇
柑坑村紫金县敬梓镇宝明养殖场

(72)发明人 马金佑

(51)Int.Cl.

C12N 9/04(2006.01)

C12N 15/53(2006.01)

C12N 15/81(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

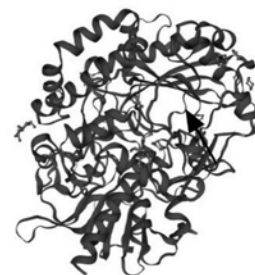
高活性的葡萄糖氧化酶的制备和应用

(57)摘要

本发明涉及高活性的葡萄糖氧化酶的制备和应用,酶氨基酸序列(glucose oxidase, GenBank:CAA34197.1)在第239位、第240位上发生突变,由原来的DF突变为AI,其有意效果在于,获得的突变体葡萄糖氧化酶比野生型酶活性高76.09%。



野生型



突变体

1. 高活性的葡萄糖氧化酶,其特征在于,所述酶氨基酸序列(glucose oxidase, GenBank:CAA34197.1)在第239位、第240位上发生突变,由原来的DF突变为AI,构建方法包括以下步骤:

1) 从NCBI上获得葡萄糖氧化酶的序列(glucose oxidase, GenBank:CAA34197.1)1),交生物公司合成,设计PCR引物5'-GGCTGAAGCTGAATTCACGTGCAACCAGCCTTTCCTCTCTCAT-3',5'-TGTTCTAGAAAGCTGGCGGCCGCAACTGAACAATGCCCTTGTTTGG-3',PCR反应结束后,加20 μ l Cloning Enhancer到PCR体系中,37 $^{\circ}$ C孵育15min,80 $^{\circ}$ C孵育15min,采用PmlI、NotI酶切pPICZ α A质粒,酶切产物经过0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收,溶于灭菌双蒸水中,将孵育后的PCR产物与纯化的线性载体混合均匀,加入In-Fusion酶,50 $^{\circ}$ C反应15min,转化大肠杆菌DH5 α ,挑取阳性克隆,送生物公司测序,得到含有野生型序列质粒的基因工程菌;

2) 质粒DNA的提取

将上述步骤含有野生型序列质粒的基因工程菌扩大培养,抽提质粒;

3) 易错PCR扩增与突变文库的构建

以步骤二获得的质粒DNA为模板,用PmlI、NotI酶切使质粒线性化,用引物序列引物5'-GGCTGAAGCTGAATTCACGTGCAACCAGCCTTTCCTCTCTCAT-3',5'-TGTTCTAGAAAGCTGGCGGCCGCAACTGAACAATGCCCTTGTTTGG-3',进行易错PCR扩增基因,易错PCR扩增体系(50 μ l)为10 \times TaKaRa Taq Buffer, dNTPs Mixture,引物各0.2 μ mol/L,模板DNA 200ng, Taq DNA聚合酶2.5U, 5mmol/l Mn $^{2+}$, 0.5U/ μ l的Taq DNA聚合酶2.5 μ l, 7mmol/l的Mg $^{2+}$, PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min, 加20 μ l Cloning Enhancer到PCR体系中, 37 $^{\circ}$ C孵育15min, 80 $^{\circ}$ C孵育15min, 将pPICZ α A质粒用PmlI、NotI酶切线性化, 酶切产物经过0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收, 溶于灭菌双蒸水中, 将孵育后的PCR产物与纯化的线性载体混合均匀, 加入In-Fusion酶, 50 $^{\circ}$ C反应15min, 转化大肠杆菌DH5 α , 涂布于固体LB平板(100 μ g/ml Amp)抗性筛选阳性转化子, 所有转化子构成突变体文库;

4) 重组质粒的电击转化

将步骤三所得阳性转化子混合转入20ml氨苄抗性LB培养基中37 $^{\circ}$ C培养过夜,使用质粒提取试剂盒提取全部质粒,使用NotI将所质粒线性化,使用胶回收试剂盒回收纯化酶切产物,取20 μ l的线性化DNA加入100 μ l毕赤酵母GS115感受态细胞混匀立即转入预冷的0.2cm电击杯中,冰浴静置5min,用吸水纸擦干电击杯外壁的水分,迅速进行电击转化,电转条件:电压1.5kv,电容25 μ F,电阻200 Ω ,电击结束后立即加入1ml冰浴的50%1M山梨醇,50%YPD到电击杯中,然后转至1.5ml无菌离心管中,28 $^{\circ}$ C,80r/min培养1h复苏;

5) 酵母转化子筛选

取100 μ l步骤四所得的复苏菌液涂布到显色筛选培养基上28 $^{\circ}$ C倒置培养,观察转化子生长状况,将红色显色圈比野生型对照大的转化子,挑出,进行复筛;

6) 将复筛通过的阳性克隆,送生物公司测序,测序结果见表3;

7) 酶的生产;

8) 酶的纯化,使用阴离子交换树脂纯化蛋白;

9) 进行GOD酶活力检测和SDS-PAGE分析;

10) 采用Bradford测定蛋白质浓度。

2. 根据权利要求1所述的高活性的葡萄糖氧化酶的制备和应用,其特征在于,所述酶用

于化工、食品、医药、饲料领域。

高活性的葡萄糖氧化酶的制备和应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程与酶工程领域,具体涉及高活性的葡萄糖氧化酶的制备和应用。

背景技术

[0002] 葡萄糖氧化酶(GOD, β -D-glucose, EC 1.1.3.4)的化学本质是一种糖蛋白,在整个蛋白质分子中,糖基部分占蛋白分子量的16%,大约80%的糖是甘露糖及相应衍生物,糖基与蛋白质的主链通过N-或O-糖苷键连接。葡萄糖氧化酶具有高效性、专一型、无毒副作用等优点,能氧化葡萄糖生成葡萄糖酸从而产生杀菌、脱氧、去除葡萄糖等特殊效果,被广泛应用于化工、食品、医药、饲料等多种领域,在食品领域,GOD作为一种重要的食品添加剂,以粉末或者液体的形式添加到各种食品和饮料中,能够消除食品中的氧气,防止腐败,延长食品保质期,用于牛奶保鲜,啤酒脱氧,蛋白制品脱糖和烘焙等食品行业;饲料中添加GOD可以改善动物肠道环境,帮助消化,促进动物健康生长,含葡萄糖氧化酶、乳铁蛋白和乳酸过氧化物的混合饲料添加剂,不仅可以预防牲畜胃肠道感染和腹泻,还可以促进动物生长,葡萄糖氧化酶在动物肠道中催化葡萄糖氧化产生过氧化氢和葡萄糖酸,过氧化氢在肠道内积累到一定浓度时,可以直接抑制大肠杆菌、巴氏杆菌、沙门氏菌、弧菌、葡萄球菌等病原微生物的生长繁殖,这种特殊的作用机理和抗生素完全不同,不会使得病原菌产生菌体抗药性;根据葡萄糖氧化酶独特的酶学特性,制成的尿糖试纸和血糖检测试剂盒已被广泛地应用临床诊断中,例如血糖的测定和尿糖的检测;在生产纺织品的过程中通常需要用到大量漂白剂,葡萄糖氧化酶催化葡萄糖的氧化反应中产生的过氧化氢可以充当漂白剂的作用。

[0003] 昆虫、细菌以及霉菌微生物中都发现了GOD,昆虫中葡萄糖氧化酶的含量较低,大规模获取样品困难,并且提取和分离纯化工艺复杂,难以进行工业化生产,微生物培养方便,可以通过高密度发酵大量获得,便于进行大规模生产,通过微生物发酵来生产GOD成为主流。目前国内市场上的葡萄糖氧化酶主要是通过黑曲霉和青霉的发酵进行大规模生产。商用酶需要具有高特异性、稳定性、高活性,已经针对葡萄糖氧化酶的商业应用开展了一系列研究。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供具有更高酶活的葡萄糖氧化酶。

[0005] 本发明的制备过程如下:

[0006] 1.从NCBI上获得葡萄糖氧化酶的序列(glucose oxidase,GenBank:CAA34197.1)1),交生物公司合成,设计PCR引物5'-GGCTGAAGCTGAATTCACGTGCAACCAGCCTTTCCTCTCAT-3',5'-TGTTCTAGAAAGCTGGCGCCGCAACTGAACAATGCCCTTGTTTGG-3',PCR反应结束后,加20 μ l Cloning Enhancer到PCR体系中,37 $^{\circ}$ C孵育15min,80 $^{\circ}$ C孵育15min,采用PmlI、NotI酶切pPICZ α A质粒,酶切产物经过0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收,溶于灭菌双蒸水中,将孵育后的PCR产物与纯化的线性载体混合均匀,加入In-Fusion酶,50 $^{\circ}$ C反应15min,转化大肠杆菌

DH5 α ,挑取阳性克隆,送生物公司测序,得到含有野生型序列质粒的基因工程菌;

[0007] 2. 质粒DNA的提取

[0008] 将上述步骤含有野生型序列质粒的基因工程菌扩大培养,抽提质粒;

[0009] 3. 易错PCR扩增与突变文库的构建

[0010] 以步骤二获得的质粒DNA为模板,用PM1I、NotI酶切使质粒线性化,用引物序列引物5'-GGCTGAAGCTGAATTCACGTGCAACCAGCCTTCTCTCAT-3',5'-TGTTCTAGAAAGCTGGCGGCCGCAACTGAACAATGCCCTTGTGG-3',进行易错PCR扩增基因,易错PCR扩增体系(50 μ l)为10 \times TaKaRa Taq Buffer,dNTPs Mixture,引物各0.2 μ mol/L,模板DNA 200ng,Taq DNA聚合酶2.5U,5mmol/l Mn²⁺,0.5U/ μ l的Taq DNA聚合酶2.5 μ l,7mmol/l的Mg²⁺,PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,35个循环,72 $^{\circ}$ C 10min,加20 μ l Cloning Enhancer到PCR体系中,37 $^{\circ}$ C 孵育15min,80 $^{\circ}$ C 孵育15min,将pPICZ α A质粒用PM1I、NotI酶切线性化,酶切产物经过0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收,溶于灭菌双蒸水中,将孵育后的PCR产物与纯化的线性载体混合均匀,加入In-Fusion酶,50 $^{\circ}$ C 反应15min,转化大肠杆菌DH5 α ,涂布于固体LB平板(100 μ g/ml Amp)抗性筛选阳性转化子,所有转化子构成突变体文库;

[0011] 4. 重组质粒的电击转化

[0012] 将步骤三所得阳性转化子混合转入20ml氨苄抗性LB培养基中37 $^{\circ}$ C 培养过夜,使用质粒提取试剂盒提取全部质粒,使用NotI将所质粒线性化,使用胶回收试剂盒回收纯化酶切产物,取20 μ l的线性化DNA加入100 μ l毕赤酵母GS115感受态细胞混匀立即转入预冷的0.2cm电击杯中,冰浴静置5min,用吸水纸擦干电击杯外壁的水分,迅速进行电击转化,电转条件:电压1.5kv,电容25 μ F,电阻200 Ω ,电击结束后立即加入1ml冰浴的50% 1M山梨,50% YPD到电击杯中,然后转至1.5ml无菌离心管中,28 $^{\circ}$ C,80r/min培养1h复苏;

[0013] 5. 酵母转化子筛选

[0014] 取100 μ l步骤四所得的复苏菌液涂布到显色筛选培养基上28 $^{\circ}$ C 倒置培养,观察转化子生长状况,将红色显色圈比野生型对照大的转化子,挑出,进行复筛;

[0015] 6. 将复筛通过的阳性克隆,送生物公司测序,测序结果见表3;

[0016] 7. 酶的生产;

[0017] 8. 酶的纯化,使用阴离子交换树脂纯化蛋白;

[0018] 9. 进行GOD酶活力检测和SDS-PAGE分析;

[0019] 10. 采用Bradford测定蛋白质浓度。

[0020] 本发明的有益效果是:

[0021] 获得了比野生型酶活性更高的突变体葡萄糖氧化酶。

附图说明

[0022] 图1葡萄糖氧化酶SDS-PAGE电泳图

[0023] 图2野生型及突变体葡萄糖氧化酶三维图

具体实施方式

[0024] 下面通过实施例对本发明做进一步详细说明,这些实施例仅用来说明本发明,并不限制本发明的范围。

[0025] 实施例1

[0026] 本实施例涉及的材料和试剂见表1,实验仪器见表2;

[0027] 表1实验材料和试剂

	考马斯亮蓝 R-250	北京索莱宝科技有限公司
	琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	大连宝生物工程有限公司
	限制性内切酶	大连宝生物工程有限公司
[0028]	Taq 酶	大连宝生物工程有限公司
	pPICZαA	Invitrogen 公司
	E.coli DH5α	Invitrogen 公司

[0029]

	毕赤酵母 GS115	Invitrogen 公司
	无水葡萄糖	国药集团化学试剂有限公司

[0030] 表2实验仪器设备

[0031]

	AB104-N电子分析天平	梅特勒-托利多上海有限公司
	PTC-200型PCR仪	美国MJResearch公司
	SW-CJ-IBU超净工作台	苏净集团安泰公司
	DYY-6D型核酸电泳仪	北京市六一仪器厂
	MiniProtein3蛋白电泳系统	美国Bio-Rad公司
	GelDoc凝胶成像系统	美国Bio-Rad公司
	UV2450紫外可见光分光光度计	日本Shimadzu公司
	Sigma3K-15高速冷冻离心机	德国Sigma公司
	TAZ-C型恒温摇床	江苏省太仓市实验设备厂
	电热培养箱	天津天宇机电有限公司
	蛋白核酸定量测定仪	德国Eppendorf公司
	FGM-5L (III) 生物反应器	上海国强生化工程装备有限公司

[0032] LB培养基配方:胰蛋白胨10g/l,酵母粉5g/l,NaCl 10g/l,pH7.0;

[0033] LB平板筛选培养基:蛋白胨1%,酵母膏0.5%,氯化钠1%,琼脂粉1.2%,NaOH调节pH至7.0,高压蒸汽灭菌,室温下冷却至50-60℃左右,加入卡那霉素溶液轻轻摇匀使其终浓度为30ng/ml;

[0034] PTM1微量元素母液:CuSO₄·5H₂O 6.0g/l,NaI 0.08g/l,MnSO₄·H₂O 3.0g/l,Na₂MoO₄·2H₂O 0.2g/l,HB0₃0.02g/l,CoCl₂·6H₂O 0.914g/l,ZnCl₂20.0g/l,FeSO₄·7H₂O65.0g/l,浓H₂SO₄5.0ml/l,生物素0.2g/l,配制过程中,先在烧杯内加入一定量的纯水,然后按顺序依次加入上述成分,加入浓H₂SO₄后,避光搅拌至全部溶解,加入生物素搅拌至溶解,定容后用0.22μm孔径无菌滤膜过滤至适宜的无菌容器,置4℃避光保存;

[0035] 发酵基础培养基(BSM):甘油40g/l 85%H₃PO₄13ml/l,KOH 10.6g/l,CaSO₄0.82g/l,K₂SO₄18.20g/l,MgSO₄·7H₂O 14.9g/l,(NH₄)₂SO₄13.2g/l,Antifoam 2040.33ml/l,PTM14.5ml/l,使用时,先不加入PTM1,以甘油为碳源的发酵基础培养基121℃高压湿热灭菌

30min,以葡萄糖为碳源的发酵基础培养基115℃高压湿热灭菌30min,降至室温后,将PTM1微量元素母液加入至生物反应器中,搅拌过夜;

[0036] 碳源补料培养基:50% (w/v) 甘油,配置时,甘油补料培养基121℃高压湿热灭菌30min,葡萄糖补料培养基115℃高压湿热灭菌30min,冷却后,每100ml碳源补料培养基加入1.2ml PTM1微量元素母液,避光保存待用;

[0037] YND培养基 (w/v):1%葡萄糖、0.67%YNB、生物素0.4mg/l,配制方法如下:先配制0.67%YNB,121℃高压湿热灭菌20min,使用时,每100ml 0.67%YNB溶液加2ml 50%葡萄糖溶液和200μl生物素母液(0.2g/l);

[0038] YPD液体培养基:1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖,高压蒸汽灭菌,室温下冷却后置于4℃冰箱保存;

[0039] 以上培养基,如果需要使用固体培养基,则在高压湿热灭菌前加入2%琼脂粉;

[0040] 如需使用抗生素,使用前在超净台加入,毕赤酵母的抗生素使用量如下:Zeocin 100μg/ml,G418250μg/ml,潮霉素750μg/ml,灭瘟素500μg/ml;

[0041] 酵母平板显色筛选培养基成分:YPD(含1.2%琼脂),1000U SBP/L、250mg G418/L、邻联大茴香胺50mg/l;

[0042] 配制方法:YPD(含1.2%琼脂),121℃高压蒸汽灭菌20min,冷却至65℃;邻联大茴香胺50mg溶于10ml蒸馏水、1000U SBP溶于10ml蒸馏水,200mg G418溶于2ml蒸馏水,混合,用0.2μm膜过滤除菌于无菌50ml离心管中,拧紧盖子,50℃水浴5min,加到65℃的YPD培养基中,摇匀,每个培养皿倒20g培养基;

[0043] 1.从NCBI上获得葡萄糖氧化酶的序列(glucose oxidase,GenBank:CAA34197.1)1),交生物公司合成,设计PCR引物5'-GGCTGAAGCTGAATTCACGTGCAACCAGCCTTTCCTCTCTCAT-3',5'-TGTTCTAGAAAGCTGGCGGCCGCAACTGAACAATGCCCTTGTTTGG-3',PCR反应结束后,加20μl Cloning Enhancer到PCR体系中,37℃孵育15min,80℃孵育15min,采用PM1I、NotI酶切pPICZαA质粒,酶切产物经过0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收,溶于灭菌双蒸水中,将孵育后的PCR产物与纯化的线性载体混合均匀,加入In-Fusion酶,50℃反应15min,转化大肠杆菌DH5α,挑取阳性克隆,送生物公司测序,得到含有野生型序列质粒的基因工程菌;

[0044] 2.质粒DNA的提取

[0045] 将上述步骤含有野生型序列质粒的基因工程菌扩大培养,抽提质粒;

[0046] 3.易错PCR扩增与突变文库的构建

[0047] 以步骤二获得的质粒DNA为模板,用PM1I、NotI酶切使质粒线性化,用引物序列引物5'-GGCTGAAGCTGAATTCACGTGCAACCAGCCTTTCCTCTCTCAT-3',5'-TGTTCTAGAAAGCTGGCGGCCGCAACTGAACAATGCCCTTGTTTGG-3',进行易错PCR扩增基因,易错PCR扩增体系(50μl)为10× TaKaRa Taq Buffer,dNTPs Mixture,引物各0.2μmol/L,模板DNA 200ng,Taq DNA聚合酶2.5U,5mmol/l Mn²⁺,0.5U/μl的Taq DNA聚合酶2.5μl,7mmol/l的Mg²⁺,PCR反应条件:95℃ 5min,94℃1min,55℃1min,72℃2min,35个循环,72℃10min,加20μl Cloning Enhancer到PCR体系中,37℃孵育15min,80℃孵育15min,将pPICZαA质粒用PM1I、NotI酶切线性化,酶切产物经过0.75%琼脂糖凝胶电泳后回收,溶于灭菌双蒸水中,将孵育后的PCR产物与纯化的线性载体混合均匀,加入In-Fusion酶,50℃反应15min,转化大肠杆菌DH5α,涂布于固体LB平板(100μg/ml Amp)抗性筛选阳性转化子,所有转化子构成突变体文库;

[0048] 4. 重组质粒的电击转化

[0049] 将步骤三所得阳性转化子混合转入20ml氨苄抗性LB培养基中37℃培养过夜,使用质粒提取试剂盒提取全部质粒,使用NotI将所质粒线性化,使用胶回收试剂盒回收纯化酶切产物,取20 μ l的线性化DNA加入100 μ l毕赤酵母GS115感受态细胞混匀立即转入预冷的0.2cm电击杯中,冰浴静置5min,用吸水纸擦干电击杯外壁的水分,迅速进行电击转化,电转条件:电压1.5kv,电容25 μ F,电阻200 Ω ,电击结束后立即加入1ml冰浴的50%1M山梨醇,50%YPD到电击杯中,然后转至1.5ml无菌离心管中,28℃,80r/min培养1h复苏;

[0050] 5. 酵母转化子筛选

[0051] 取100 μ l步骤四所得的复苏菌液涂布到显色筛选培养基上28℃倒置培养,观察转化子生长状况,将红色显色圈比野生型对照大的转化子,挑出,进行复筛;

[0052] 6. 将复筛通过的阳性克隆,送生物公司测序,测序结果见表3;

[0053] 7. 酶的生产

[0054] 将复选通过的菌株在摇瓶中培养,进行甘油分批及补料培养时种子培养基使用MGY培养基,进行葡萄糖分批及补料培养时种子培养基使用YND培养基,种子培养方法如下:

[0055] a. 一级种子培养:从-80℃中取出冻存种子,按1:50接入到50ml MGY培养基或者YND培养基中,30℃、200r/min培养至对数生长期;

[0056] b. 二级种子培养:菌株按1:8比例,将一级种子接入到300ml MGY培养基或者YND培养基中,30℃、200r/min培养至对数生长期;

[0057] 野生菌株和突变菌株的分批及补料培养方法如下:

[0058] a. 发酵罐灭菌之前校正溶解氧电极和pH电极;

[0059] b. 待BSM发酵基础培养基灭菌完成并冷却至30℃之后,在火焰保护下按照4.5ml/1发酵培养基的量加入PTM1微量元素母液;

[0060] c. 取样,用离线pH计测定发酵罐内培养基的pH值,并与在线的pH计读数做比较,计算偏差;

[0061] d. 逐步加入25%氨水,至发酵罐内培养基pH值接近5.0,30℃、200r/min搅拌过夜;

[0062] e. 溶解氧100%校正:接种之前,通气量调节至1vvm,搅拌转速调节至200r/min,罐压调节至0.02MPa,稳定30min后将此状态设定为溶解氧100%的状态;

[0063] f. 接种:将种子培养基在火焰保护下全部接入发酵罐中,培养温度30℃开始分批培养;

[0064] g. 转速及通气量调节:保持发酵过程中溶解氧始终大于30%,发酵培养过程中可以通过在200-1000r/min范围内改变转速来调节溶解氧,也可以在3-6l/min范围内调节通气量,当搅拌及通气量达到最大值时可以适量向进气中混合通入纯氧来满足溶解氧要求;

[0065] h. pH调节:发酵过程中设定pH误差为 5.0 ± 0.1 ,通过发酵罐联动的pH调节蠕动泵自动调节;

[0066] i. 每隔4h测定OD600或菌体湿重;

[0067] 补料控制:当发酵过程中溶解氧突然开始急剧上升,视为发酵培养基中的碳源已经被消耗完,开始缓慢补入相应的碳源补料培养基以维持菌株继续生长,8000rpm离心5min收集上清;

[0068] 8. 酶的纯化

[0069] 将步骤七得到的上清液,使用截流量为100kDa的膜包,在蠕动泵作用下降发酵液浓缩至20ml左右,将浓缩后的发酵液经12000rpm离心15min,将其转移至截留量为50kDa的透析袋中,随后置于合适pH的缓冲液中过夜透析,将透析后的发酵液12000rpm离心15min,使用阴离子交换树脂对目标酶蛋白进行纯化;

[0070] 9. 进行GOD酶活力检测和SDS-PAGE分析;

[0071] 10. 蛋白质浓度测定

[0072] 配制一组浓度分别为0.10mg/ml,0.08mg/ml,0.06mg/ml,0.04mg/ml,0.02mg/ml,0mg/ml的牛血清蛋白(BSA)溶液,取1ml Bradford染液与100 μ l不同浓度BSA溶液反应30min,在595nm处测定这组溶液的吸光度值,得到蛋白质浓度对吸光度值的一条标准曲线,将纯化蛋白稀释至适宜浓度,按照上述方法测定吸光度值,根据标准曲线即可得到蛋白浓度;

[0073] 野生型和突变型葡萄糖氧化酶在生产水平上没有明显差异,纯化酶的回收率约为65.8-72.3%,纯化后突变酶的纯度与分子量通过SDS-PAGE分析估计,突变酶分子量与野生型大小相当约65KD,野生型及突变体葡萄糖氧化酶三维图见图2。

[0074] 表3突变体的测序结果

突变体编号	原始核酸序列	突变后核酸序列	原始氨基酸序列	突变后氨基酸序列
突变体239-240	GACTTC	GCAATC	DF	AI

[0076] 实验一:酶活的测定方法

[0077] 用邻联茴香胺和辣根过氧化物酶(HRP)进行酶活测定:总反应体系3.1ml,反应温度37 $^{\circ}$ C,取100 μ l稀释完的纯化酶液和100 μ l HRP(300U/ml)到2.9ml邻联茴香胺-葡萄糖(27mmol/l邻联茴香胺,10% (w/v) 葡萄糖,pH5.0)中,利用UV1800在500nm波长处,测定1min内吸光值的变化为 ΔG ,氧化的邻联茴香胺在500nm处的摩尔消光系数为 $7.5 \times 10^3 / \text{Mcm}$,酶活(U/ml) = $\Delta G \times 3.1 \times \text{稀释倍数} / 0.75$ 。1个酶活力单位是指37 $^{\circ}$ C、pH5.0条件下,在1min内转化1 μ M葡萄糖生成1 μ M葡萄糖酸和H₂O₂所需的酶量。

[0078] 实验结果见表4。

[0079] 表4酶活测定结果

名称	酶活 (U/mg)	提高比率
野生型	141.8 \pm 0.06	-
突变体239-240	249.7 \pm 0.05	76.09%

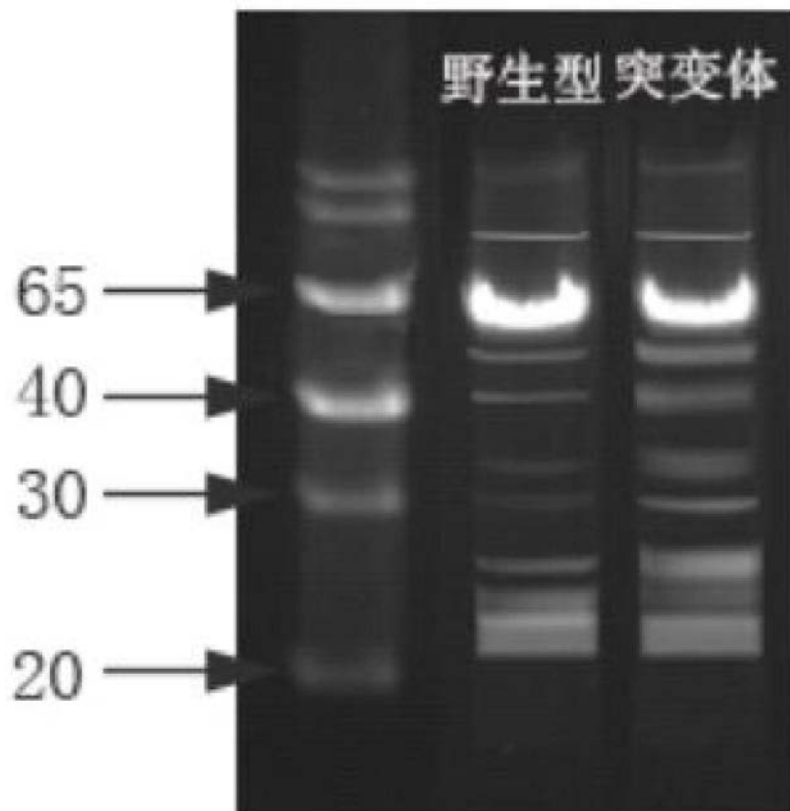


图1

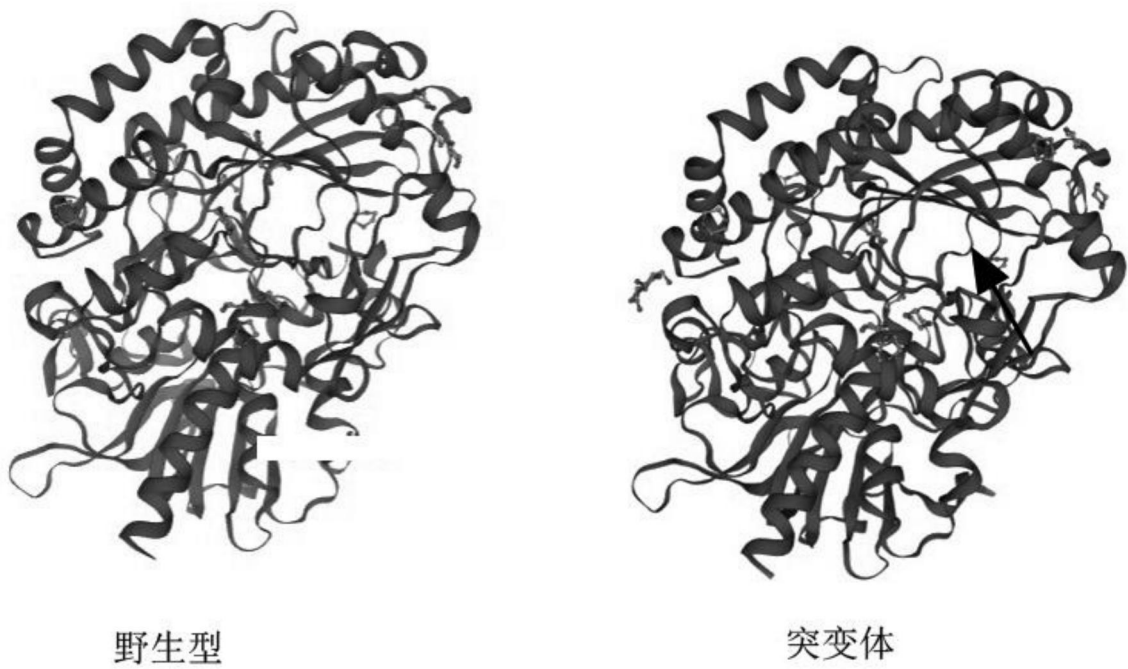


图2