

# 天冬酰胺合成酶的基因挖掘与酶学性质研究

许景龙, 胡佳桂, 罗玮

(江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214000)

**摘要:** 天冬酰胺合成酶 (Asparagine Synthetase, AS, EC 6.3.1.1) 是一种以氨或者谷氨酰胺为氨供体催化天冬氨酸转化为天冬酰胺的 ATP 依赖性酶。利用天冬酰胺合成酶合成天冬酰胺的生物合成法相比于植物提取法及化学法具有反应条件温和、副产物少、不受原料限制和污染小等优点, 具有较高的应用前景。本研究通过基因挖掘的手段, 共筛选出 12 种不同来源的 AS, 其中酶活最高的是来源于唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*) 的天冬酰胺合成酶 Lsa-AS。酶学性质研究表明: 该酶最适温度为 41°C, 最适 pH 为 8.0; 在 30°C, pH 为 8 的缓冲液中的半衰期为 857.85 min, 在 pH 为 5 的缓冲液中, 4°C 保存 24 h 仍剩余 99% 以上的酶活; 该酶为金属依赖性酶, 不添加金属离子没有活性, 常见的金属离子中  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  可以激活酶的活性, 其中添加  $Fe^{2+}$  酶活最高; 低浓度的有机溶剂对酶活的影响不大, 加入 5% 的十二烷基磺酸钠 (SDS) 导致酶完全失活。酶动力学分析结果表明该酶对 L-天冬氨酸的  $K_m$  为 0.78 mM, 相应的  $V_{max}$  为 50.22 nmol/(min·mg), 对于  $NH_4^+$  的  $K_m$  为 6.5 mM,  $V_{max}$  为 53.76 nmol/(min·mg), 对于 ATP 的  $K_m$  值为 2.24 mM,  $V_{max}$  为 46.00 nmol/(min·mg)。天冬酰胺合成酶基因的成功表达为 L-天冬酰胺的生物合成提供了可能。

**关键词:** 分子生物学; 天冬酰胺合成酶; 基因挖掘; 克隆表达; 酶学性质

**中图分类号:** Q786

## Gene mining and enzymatic properties analysis of Asparagine Synthetase

XU jinglong, HU jiagui, LUO wei

(School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214000)

**Abstract:** Asparagine Synthetase (AS, EC 6.3.1.1) is an ATP-dependent enzyme that catalyzes the conversion of aspartic acid to asparagine using ammonia or glutamine as the ammonia donor. Compared with plant extraction and chemical methods, the synthesis of asparagine by asparagine synthetase has the advantages of mild reaction conditions, fewer by-products, no restrictions on raw materials, and environmental friendliness, so it has application prospects. In this study, 12 different species of AS were screened by means of gene mining. Among them, Lsa-AS, a asparagine synthetase from *Lactobacillus salivarius*, is the highest enzyme activity. The enzymatic properties of recombinant Asparagine Synthetase was characterized. The optimal temperature of the enzyme is 41 °C and the optimal pH is 8.0. The half-life is 857.85 min at 30°C in the Tris-HCl (pH 8). 99.43% of the enzyme activity was retained even after storing in the buffer solution at pH 5.0 for 24 h. Lsa-AS is a metal-dependent enzyme, and there is no enzyme activity without adding metal ions. Among the common metal ions,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , and  $Fe^{2+}$  can activate the enzyme activity, and the enzyme activity with the addition of  $Fe^{2+}$  is the highest. The effect of addition low concentration of organic solvents on the enzyme activity is little, and the addition of 5% sodium dodecyl sulfonate (SDS) result in complete inactivation of the enzyme. The kinetic analysis results show that the  $V_{max}$  and  $K_m$  value of Lsa-AS for L-aspartate was measured to be 50.22 nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> and 0.78 mM. The  $V_{max}$  and  $K_m$  value of Lsa-AS for  $NH_4^+$  was measured to be 53.76 nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> and 6.5 mM. The  $V_{max}$  and  $K_m$  value of Lsa-AS for ATP was measured to be 46.00 nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> and 2.24 mM. The successful expression of asparagine synthase gene provides the possibility for the biosynthesis of L-asparagine.

**Key words:** molecular biology; Asparagine Synthase; gene mining; clonal expression; enzymatic properties

**作者简介:** 许景龙 (1994-), 女, 主要研究方向: 分子生物学, 基因工程

**通信联系人:** 罗玮 (1981-), 男, 副教授。硕导, 主要研究方向: 代谢工程与生物催化. E-mail: wlue@jiangnan.edu.cn

## 0 引言

L-天冬酰胺作为一种常见的氨基酸广泛应用于医药、化工、食品等领域。在生物医药方面，天冬酰胺可以作为某些药物的前体<sup>[1; 2]</sup>，还能够维持中国仓鼠卵巢细胞（CHO）的生长和提高其生产单抗的能力<sup>[3]</sup>。在食品方面，L-天冬酰胺与糖发生美拉德反应可以赋予食品独特的色泽和风味，同时还具有抗氧化等功效<sup>[4]</sup>。在化工方面，L-天冬酰胺可以作为绿色催化剂或者合成催化剂的前体<sup>[5; 6]</sup>。

合成天冬酰胺的方法多为植物提取法和化学法，有关生物法的报道较少。植物提取法主要是以富含天冬酰胺的植物为原料提取天冬酰胺<sup>[7]</sup>。化学法是利用马来酸酐或者天冬氨酸与氨水经化学催化剂催化制得<sup>[8; 9]</sup>。生物法是利用天冬酰胺合成酶催化天冬氨酸合成天冬酰胺，与另外两种方法相比具有副反应少、能耗低、设备简单和污染小等优点，但天冬酰胺合成酶是 ATP 依赖性酶<sup>[10]</sup>，由于 ATP 的性质不稳定、价格较为昂贵限制了生物法的应用。天冬酰胺合成酶可分为两类： $\text{NH}_4^+$ 依赖性的天冬酰胺合成酶（AS-A）及谷氨酰胺依赖性的天冬酰胺合成酶（AS-B）。AS-A 由 *asnA* 基因编码，只能利用  $\text{NH}_4^+$  作为酰胺供体，只存在于原核生物中。AS-B 由 *asnB* 基因编码，可以利用  $\text{NH}_4^+$  或谷氨酰胺作为酰胺供体，广泛存在于各类生物体内<sup>[11]</sup>。最近的研究发现来自 *Leishmania donovani* 的 AS-A 不仅可以利用  $\text{NH}_4^+$  还可以利用谷氨酰胺作为酰胺供体<sup>[12]</sup>。李奇<sup>[13; 14]</sup>等人先后将 *Escherichia coli* (*E. coli*) 的天冬酰胺合成酶基因分别转化进 *E. coli* BL21(DE3) 和产 L-天冬氨酸酶的 *E. coli* 中表达，利用两种重组大肠杆菌全细胞分别催化天冬氨酸和富马酸合成天冬酰胺，其中 ATP 的供应是通过大肠杆菌自身的糖酵解作用。马江锋<sup>[15]</sup>等人将 *E. coli* 中编码富马酸酶的基因敲除，插入编码 L-天冬氨酸酶和 L-天冬酰胺合成酶编码基因，得到主产 L-天冬酰胺的重组大肠杆菌。

本研究通过基因挖掘技术克隆了不同来源的天冬酰胺合成酶。经过筛选后，发现来自唾液乳杆菌（*Lactobacillus salivarius*）的 *LsaAS-A* 具有较高的催化活性。为了能够最大限度利用 *LsaAS-A* 合成天冬酰胺，研究了其最适温度、最适 pH、金属离子依赖性、有机溶剂耐受性、动力学参数等酶学性质。将其用于生物法制备 L-天冬酰胺的研究，为 L-天冬酰胺的工业化生产做出一定的贡献。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 培养基

LB: 胰蛋白胨 1%，酵母提取物 0.5%，NaCl 1%，pH 7.0-7.2，固体加入琼脂 2%，121℃ 灭菌 20 min。

LB/Kana: LB 加入终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  的卡纳霉素。

TB/Kana: 胰蛋白胨 1.2%，酵母提取物 2.4%， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.23%， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.25%，甘油 0.4%，

pH 7.0, 121°C灭菌 20 min 加入终浓度为 50 µg/mL 的卡纳霉素。

80 SB/Kana: 胰蛋白胨 2.5%, 酵母提取物 2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%, 葡萄糖 3%, 115°C灭菌 30 min 加入终浓度为 50 µg/mL 的卡纳霉素。

### 1.1.2 实验所用菌株及试剂

85 本文所用的菌种购自江南大学生物工程学院菌种保藏库及普通微生物保藏管理中心, 所用质粒为本实验室保藏, 基因及引物由苏州金维智生物工程有限公司合成, 细菌全基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA 柱纯化试剂盒购自上海生工有限公司, 限制性内切酶、DNA 重组酶购自 TAKARA。

## 1.2 方法

### 1.2.1 天冬酰胺合成酶的基因挖掘

90 从文献中选择来自 *E. coli* 的 AS-A 及 AS-B 作为探针<sup>[13;16]</sup>, 在 NCBI 数据库中 BLAST, 筛选出不同相似度的 AS-A 及 AS-B。

### 1.2.2 天冬酰胺合成酶的克隆及重组菌的构建

95 利用筛选到的天冬酰胺合成酶基因 (*asn*) 序列设计引物, 以各个菌种的基因组为模板 PCR 扩增出不同的 *asn*, 将 pET28a 及 pMA5 用相应限制性内切酶酶切后, 用 DNA 重组酶将各个基因分别与 pET28a 和 pMA5 连接, 将带有各个天冬酰胺合成酶基因的重组 pET28a 及 pMA5 转化进 *E. coli* JM109 中, 挑选阳性克隆子, 测序, 提取重组 pET28a 及重组 pMA5 质粒, 分别转化进 *E. coli* BL21(DE3) 及 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) WB600 中, 挑取阳性克隆提取质粒酶切验证。

### 1.2.3 天冬酰胺合成酶基因在大肠杆菌中表达

100 将各个构建成功的重组大肠杆菌在 LB/Kana 平板上划线过夜培养, 挑取单菌落于 LB/Kana 液体培养基过夜培养, 1%接种量接种于 TB/Kana 液体培养基中, 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4-0.6, 加入终浓度为 0.1 mM 的 isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside (IPTG), 16°C培养 24 h。将培养后的大肠杆菌 4°C, 8000 r/min 离心 10 min, 去上清, 用灭菌的生理盐水洗涤两遍后用 Tris-HCl (pH 8.0) 定容到所取发酵液的体积后悬浮, 超声破碎至澄清 (超声条件超声 1 s, 间歇 2 s, 功率 80%, 共 10 min), 超声后的样品 4°C, 12000 r/min 离心 10 min, 105 取上清及沉淀采用 SDS-PAGE 和天冬酰胺合成酶活力测定检测目标蛋白的表达。

### 1.2.4 天冬酰胺合成酶基因在枯草芽孢杆菌中表达

将各个构建成功的重组枯草芽孢杆菌在 LB/Kana 平板上划线过夜培养, 挑取单菌落于 LB/Kana 液体培养基过夜培养, 1%接种量接种于 LB/Kana 液体培养基中, 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4-0.6 时 1%接种量接种于 SB/Kana 培养基中, 30°C培养 24 h。培养后的细胞处理同 1.2.3。

## 110 1.2.5 天冬酰胺合成酶活力测定

酶反应体系: 总体系 1 mL, 100 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0), 20 mM L-Asp, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM ATP, 0.1 mL 酶液, 37°C 催化 15 min, 样品煮沸 5 min 终止反应, 12000 r/min 4°C 离心 5 min, 取上清经 0.22 μm 水膜过滤, 注入样品瓶中备用。以每分钟催化 L-Asp 产生 1 μmol L-Asn 所需的酶量定义为一个酶活单位。

115 天冬酰胺、天冬氨酸及谷氨酰胺的测定方法 (HPLC): A 相: 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.8; B 相: 乙腈: 甲醇: 水=45:45:10; 选用 Agilent Zorbax Eclipse AAA, 4.6×150 mm, 5 μm 液相柱; 控制条件为: 柱温 40°C, 检测波长 338 nm, 流速 1.0 mL/min, 进样体积 10 μL, 分析时间 24 min, 泵程序为: 0-2 min 内流动相 B 为 5%, 2-12 min, 流动相 B 由 5% 升至 57%, 13 min 时升至 100% 维持 4 min, 19 min 降至 5%, 维持 5 min。

## 120 1.3 天冬酰胺合成酶酶学性质

## 1.3.1 最适温度

将反应体系分别置于 20-60°C 水浴 10 分钟, 酶水浴 2 分钟, 测定酶活力。

## 1.3.2 热稳定性

将酶液置于 30、40 和 50°C 水浴中每间隔一定时间取样, 测定酶活力。

## 125 1.3.3 最适 pH

使用 pH 为 5-10 的反应缓冲液配置反应体系, 测定酶活。

## 1.3.4 pH 稳定性

将酶置于 pH 为 4-10 的反应缓冲液中, 4°C 放置 24 h 后测定酶活力。

## 1.3.5 金属离子对酶活的影响

130 向反应液中加入终浓度为 10 mM 不同种类的金属离子, 测定酶活力。

## 1.3.6 有机试剂对酶活的影响

加入 5% 或 10% 的有机试剂, 4°C 放置 24 h, 测定酶活力。

1.3.7 酶反应动力学常数  $K_m$  及  $V_{max}$  测定

135 为了确定  $K_m$  及  $V_{max}$ , 底物的浓度在以下范围内变化: L-Asn 0.1-10 mM, NH<sub>4</sub>Cl 0.5-50 mM 和 ATP 0.1-20 mM, 其余底物浓度过量 (100 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0), 20 mM L-Asp, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM ATP)。反应温度为 41°C, 监测 15 min 内 Asn 的变化。

2 结果与分析

2.1 天冬酰胺合成酶的基因挖掘

选择来自 *E. coli* 的 AS-A 及 AS-B 的基因为探针在 NCBI 中 BLAET，为扩大基因搜索范围，以基因相似度作为依据在 20%-100%梯度筛选。如表 1 所示，筛选出 8 个 *asnB*，4 个 *asnA*。

表 1 天冬酰胺合成酶的基因筛选

Tab. 1 Gene screening of asparagine synthetase

序号	基因	酶	来源菌株	Identity to <i>EcoAS</i>
1	<i>asnB</i>	<i>EcoAS-B</i>	<i>Escherichia coli</i>	100%
2	<i>asnB</i>	<i>SplAS-B</i>	<i>Serratia plymuthica</i>	93%
3	<i>asnB</i>	<i>HalAS-B</i>	<i>Hafnia alvei</i>	86%
4	<i>asnB</i>	<i>VruAS-B</i>	<i>Vibrio ruber</i>	76%
5	<i>asnB</i>	<i>SmaAS-B</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	60%
6	<i>asnB</i>	<i>SpaAS-B</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	56%
7	<i>asnB</i>	<i>PexAS-B</i>	<i>Penicillium expansum</i>	49%
8	<i>asnB</i>	<i>BfiAS-B</i>	<i>Bacillus firmus</i>	28%
9	<i>asnA</i>	<i>EcoAS-A</i>	<i>Escherichia coli</i>	100%
10	<i>asnA</i>	<i>HalAS-A</i>	<i>Hafnia alvei</i>	77%
11	<i>asnA</i>	<i>PmaAS-A</i>	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	69%
12	<i>asnA</i>	<i>LsaAS-A</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	53%

2.2 天冬酰胺合成酶基因的克隆表达

利用基因组提取试剂盒提取各个菌种的基因组，并以此作为模板，通过 PCR 扩增各个菌种的天冬酰胺合成酶基因。将各个基因分别与大肠杆菌表达载体 pET28a 和枯草芽孢杆菌表达载体 pMA5 相连，分别转化进大肠杆菌及枯草芽孢杆菌中。为了确定重组菌是否构建成功，将各个重组菌中提取的质粒进行双酶切验证。

各个大肠杆菌重组质粒双酶切电泳如图 1a 所示，双酶切后的质粒有两个片段，一条大小约为 5300 bp，判断其为线性的 pET28a，在 1800bp 的条带为 *asnB* 基因，1000bp 左右的为 *asnA* 基因，基因测序后，与数据库基因比对，判断重组质粒构建成功；各个枯草芽孢杆菌重组质粒双酶切电泳如图 1b 所示，双酶切后有两个片段，一条大小约为 7300 bp，判断为线性的 pMA5，在 1800bp 的为 *asnB* 基因，1000bp 左右的为 *asnA* 基因，基因测序后，与数据库基因比对，判断重组质粒构建成功。



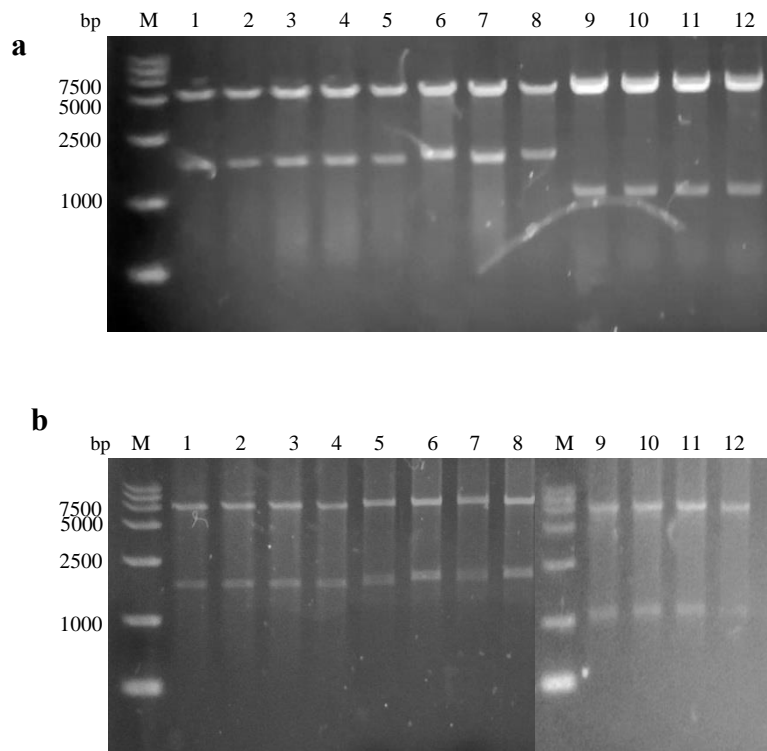


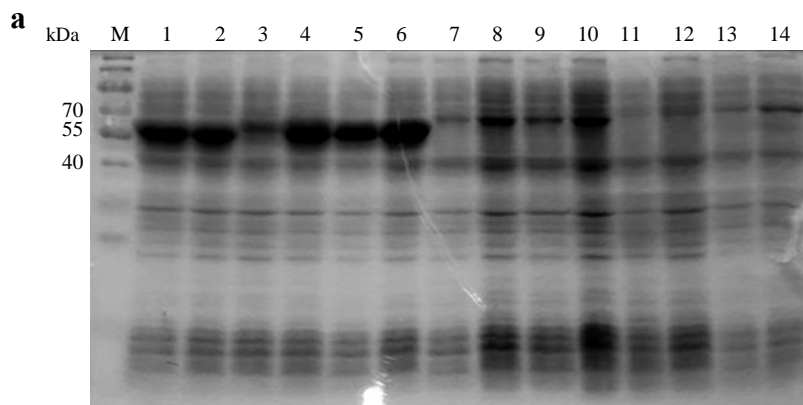
图 1 重组质粒双酶切电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of enzyme digestion products of recombinant plasmid

注: **a** M: DNAmarker 1; pET28a-*EcoAS-B*; 2: pET28a-*SplAS-B*; 3: pET28a-*HalAS-B*; 4: pET28a-*VruAS-B*; 5: pET28a-*SmaAS-B*; 6: pET28a-*SpaAS-B*; 7: pET28a-*PexAS-B*; 8: pET28a-*BfiAS-B*; 9: pET28a-*EcoAS-A*; 10: pET28a-*HalAS-A*; 11: pET28a-*PmaAS-A*; 12: pET28a-*LsaAS-A*

**b**: M: DNAmarker 1; pMA5-*EcoAS-B*; 2: pMA5-*SplAS-B*; 3: pMA5-*HalAS-B*; 4: pMA5-*VruAS-B*; 5: pMA5-*SmaAS-B*; 6: pMA5-*SpaAS-B*; 7: pMA5-*PexAS-B*; 8: pMA5-*BfiAS-B*; 9: pMA5-*EcoAS-A*; 10: pMA5-*EcoAS-A*; 11: pMA5-*PmaAS-A*; 12: pMA5-*LsaAS-A*

分别用 1.2.3 及 1.2.4 的方法发酵重组大肠杆菌及枯草芽孢杆菌产酶, 重组大肠杆菌破碎后的上清液及沉淀如图 2a、2b 所示, *EcoAS-B*、*SplAS-B*、*HalAS-B*、*EcoAS-A* 的可溶性蛋白表达量较高, 而 *VruAS-B*、*SmaAS-B* 可溶性蛋白表达量较少, 其他蛋白没有表达可溶性蛋白。重组枯草芽孢杆菌 SDS-PAGE 如图 2c、2d 所示, *HalAS-A*、*LsaAS-A*、*EcoAS-B*、*SplAS-B*、*HalAS-B*、*VruAS-B*、*SmaAS-B* 在枯草芽孢杆菌中实现了可溶性表达。



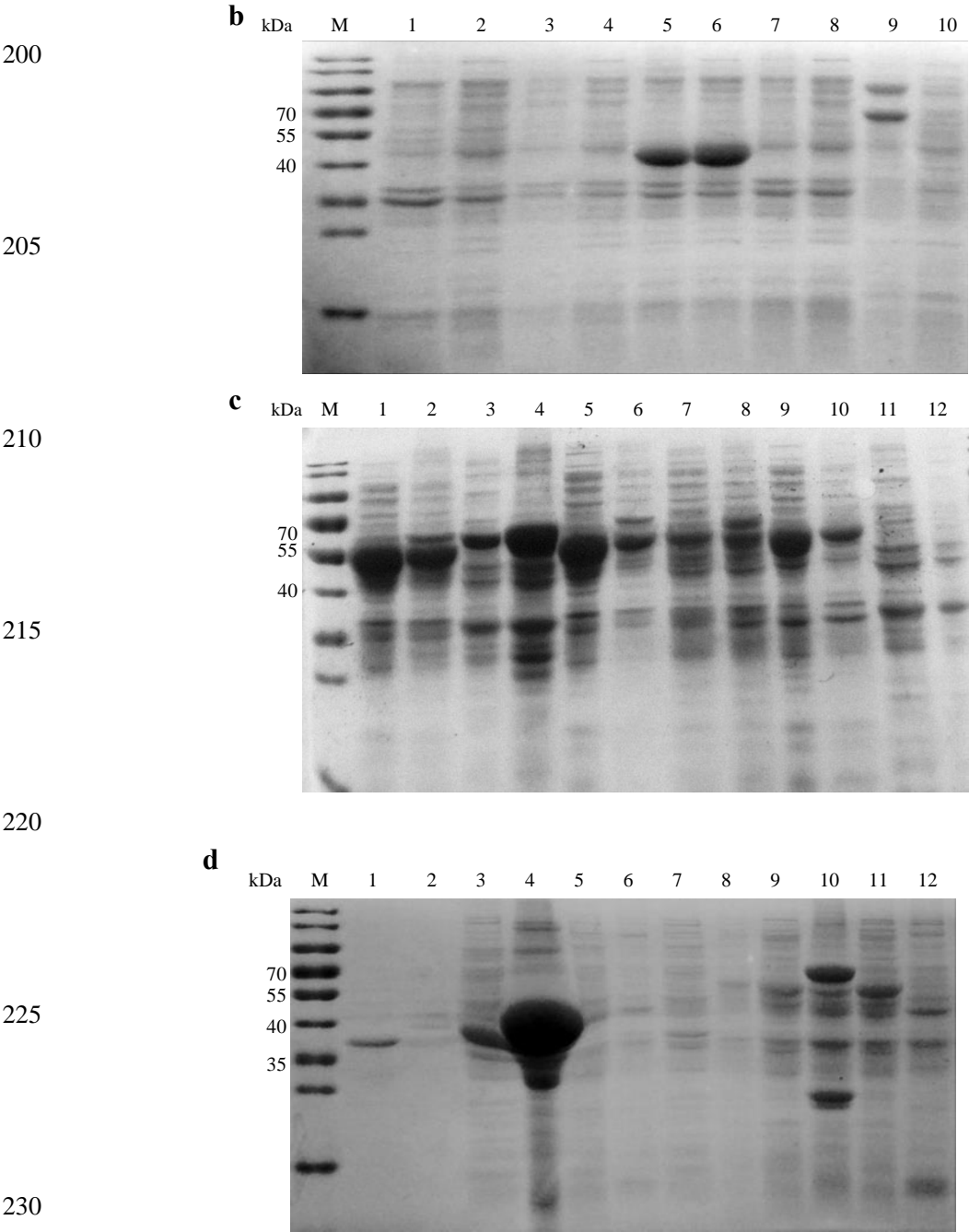


图 2 重组天冬酰胺合成酶表达电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of induced expression of leucine dehydrogenase

注：a M：蛋白 marker；1：诱导表达的 BL21(DE3)/pET28a-*EcoAS*-B 上清；2：诱导表达的 BL21(DE3)/pET28a-*EcoAS*-B 沉淀；3：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*SplAS*-B 上清；4：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*SplAS*-B 沉淀； 5：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*HalAS*-B 上清； 6：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*HalAS*-B 沉淀；7：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*VruAS*-B 上清； 8：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*VruAS*-B 沉淀；9：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*SmaAS*-B 上清； 10：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*SmaAS*-B 沉淀； 11：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*SpaAS*-B 上清；12:诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*SpaAS*-B 沉淀； 13：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*PexAS*-A 上清； 14：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*PexAS*-A 沉淀；

b M：蛋白 marker；1：诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*BfiAS*-B 上清；2：诱导表达的 BL21(DE3)/

pET28a-*Bfi*AS-B 沉淀; 3: 诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a- *Hal*AS-A 上清; 4: 诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-  
*Hal*AS-A 沉淀; 5: 诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a- *Eco*AS-A 上清; 6: 诱导表达的 BL21(DE3)/  
pET28a-*Eco*AS-A 沉淀; 7: 诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a-*Pma*AS-A 上清; 8: 诱导表达的 BL21(DE3)/  
pET28a- *Pma*AS-A 沉淀; 9: 诱导表达的 BL21(DE3)/ pET28a- *Lsa*AS-A 上清; 10: 诱导表达的 BL21(DE3)/  
pET28a- *Lsa*AS-A 沉淀;

c M: 蛋白 marker; 1: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Eco*AS-B 上清; 2: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Eco*AS-B  
沉淀; 3: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Spl*AS-B 上清; 4: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Spl*AS-B 沉淀; 5: 诱  
导表达的 WB600/pMA5-*Hal*AS-B 上清; 6: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Hal*AS-B 沉淀; 7: 诱导表达的  
WB600/pMA5-*Vru*AS-B 上清; 8: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Vru*AS-B 沉淀; 9: 诱导表达的  
WB600/pMA5-*Sma*AS-B 上清; 10: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Sma*AS-B 沉淀; 11: 诱导表达的  
WB600/pMA5-*Spa*AS-B 上清; 12:诱导表达的 WB600/pMA5-*Spa*AS-B 沉淀;

d M: 蛋白 marker; 1: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Lsa*AS-A 上清; 2: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Lsa*AS-A  
沉淀; 3: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Hal*AS-A 上清; 4: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Hal*AS-A 沉淀; 5: 诱  
导表达的 WB600/pMA5-*Pex*AS-A 上清; 6: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Pex*AS-A 沉淀; 7: 诱导表达的  
WB600/pMA5-*Eco*AS-A 上清; 8: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Eco*AS-A 沉淀; 9: 诱导表达的  
WB600/pMA5-*Pex*AS-A 上清; 10: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Pex*AS-A 沉淀; 11: 诱导表达的  
WB600/pMA5-*Bfi*AS-B 上清; 12: 诱导表达的 WB600/pMA5-*Bfi*AS-B 沉淀。

为了进一步确定重组菌 AS 的表达情况, 破碎后的细胞离心取上清进行酶活力测定, 如  
表 2 所示在 *E. coli* BL21(DE3)中成功表达了有活性的 *Eco*AS-A、*Eco*AS-B、*Spl*AS-B、*Hal*AS-B;  
在 *B. subtilis* WB600 中成功表达了有活性的 *Hal*AS-A、*Lsa*AS-A、*Eco*AS-B、*Spl*AS-B、*Hal*AS-B、  
*Vru*AS-B、*Sma*AS-B。由表 2 可知, 催化酶活力最高的是枯草芽孢杆菌表达的 *Lsa*AS-A。

表 2 不同来源的天冬酰胺合成酶的催化活力

Tab. 2 activity of Asparagine Synthetase		
酶	酶活 <sup>a</sup> /(U/mL)	酶活 <sup>b</sup> /(U/mL)
<i>Eco</i> AS-B	0.149±0.0045	0.137±0.0072
<i>Spl</i> AS-B	0.058±0.0070	0.064±0.0048
<i>Hal</i> AS-B	0.172±0.0044	0.193±0.012
<i>Vru</i> AS-B	ND	0.027±0.0015
<i>Sma</i> AS-B	ND	0.167±0.025
<i>Eco</i> AS-A	0.851±0.0375	ND
<i>Hal</i> AS-A	ND	0.129±0.0648
<i>Lsa</i> AS-A	ND	1.356±0.049

注: 酶活<sup>a</sup>: 宿主为 *E. coli* BL21(DE3); 酶活<sup>b</sup>: 宿主为 *B. subtilis* WB600; 没有表达出有活性的酶没有在表  
格中给出; ND 没有测到产物 L-Asn。

### 2.3 *Lsa*AS-A 的酶学性质研究

#### 2.3.1 *Lsa*AS-A 的最适温度及热稳定性

温度对酶的催化效率有很大的影响。在一定的温度范围内, 酶活力随着温度的升高而升  
高, 但过高的温度会使酶变性失活。如图 3a 所示, *Lsa*AS-A 活力随着温度呈现先上升后下



降的变化趋势, 40℃酶活最高, 超过 50℃时, 酶活力迅速下降, 60℃时酶活力仅为最适温度的 1.38%。为了进一步测定 *LsaAS-A* 的最适温度, 测定了 35-45℃的酶活力, 如图 3b 所示, 该酶的最适温度为 41℃。

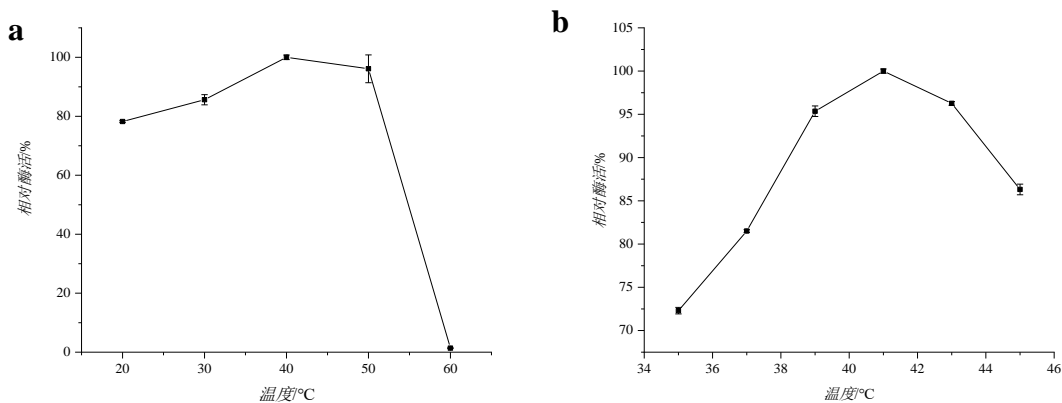


图 3 温度对 *LsaAS-A* 活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the activity of *LsaAS-A*

将 *LsaAS-A* 置于温度为 30℃、40℃和 50℃恒温水浴锅, 每间隔一定时间取出, 在 37℃预热后测定剩余酶活力。以一阶指数衰减公式为依据作图, 如图 4 所示, 直线的斜率为失活速率常数, 根据失活半衰期可以得到 30℃、45 和 50℃的半衰期分别为 857.85、94.56 min、50.99 min, 先前的报道中, 大肠杆菌的 AS-A 在 45℃的半衰期小于 1 分钟, 在 50℃保存 5 min 完全失活<sup>[17]</sup>。 *LsaAS-A* 比大肠杆菌 AS-A 稳定性高。

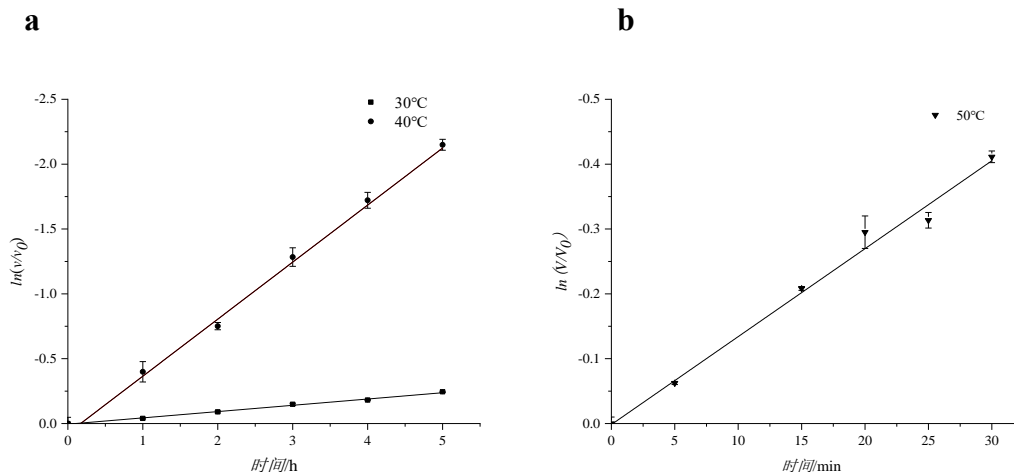


图 4 *LsaAS-A* 在 30、40 和 50℃的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of *LsaAS-A* at 30, 40 and 50℃

### 2.3.2 *LsaAS-A* 的最适反应 pH 及 pH 稳定性

pH 不仅影响底物的电离, 过酸过碱就有可能破坏酶的空间结构, 引起酶的失活。将反

应体系用不同 pH 的缓冲液配置, 37°C 反应 15 分钟。如图 5 所示, 随着 pH 的升高酶活力先升高再下降, *LsaAS-A* 的最适 pH 为 8.0, 醋酸缓冲液及 Tris-HCl 缓冲液比硼酸缓冲液更适合作为该酶的反应缓冲液。

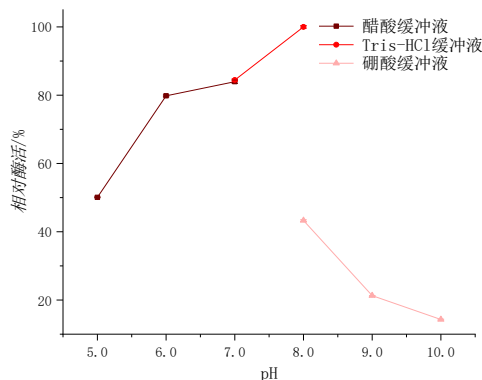


图 5 pH 对 *LsaAS-A* 活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on the activity of *LsaAS-A*

将 *LsaAS-A* 在不同 pH 条件下 4°C 保存 24 h 并测定其残留活性, 研究了 pH 的稳定性。如图 6 所示, 随着 pH 的升高稳定性先升高后下降, 在 pH 为 5 的醋酸缓冲液中最稳定, 与未保存 24 h 相比仅降低了 0.57%, pH 在 4.0-9.0 稳定性都在 74% 以上, pH 超过 9.0 后稳定性下降迅速, 只有 29.8%, 可能是因为 pH 过高导致酶的空间结构被破坏。

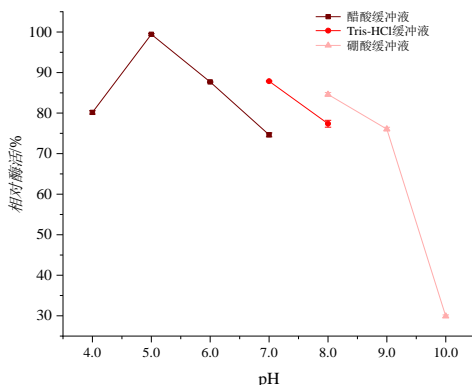


图 6 *LsaAS-A* 在不同 pH 的缓冲液中的稳定性

Fig. 6 Stability of *LsaAS-A* at different pH

### 2.3.3 金属离子对 *LsaAS-A* 酶活的影响

金属离子在大多数的酶促反应中有重要影响, 有些金属离子充当激活剂还有一些是抑制剂<sup>[18]</sup>。向反应体系中添加 10 mM 的金属离子, 研究了金属离子对酶活的影响。如表 3 所示  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  对酶活有激活作用, 其中添加  $Fe^{2+}$  对酶活的激活程度最大, 是  $Mg^{2+}$  的 136%,  $Zn^{2+}$  激活程度较小, 是  $Mg^{2+}$  的 23.61%。不添加金属酶活为 0, 说明 *LsaAS-A* 是金属依赖性酶。与之前的报道类似,  $Mg^{2+}$  与 AS 的 C 端活性位点结合参与反应<sup>[19]</sup>。

表 3 不同金属离子对 *LsaAS-A* 酶活力的影响  
Tab. 3 Effect of metal ions on the activity of *LsaAS-A*

金属离子	相对酶活/%
对照	ND
Na <sup>+</sup>	ND
Ca <sup>2+</sup>	ND
Cu <sup>2+</sup>	ND
Fe <sup>3+</sup>	ND
Mg <sup>2+</sup>	100
Mn <sup>2+</sup>	118.05±0.47
Fe <sup>2+</sup>	136.36±0.25
Zn <sup>2+</sup>	23.61±0.13

注：对照：不添加金属离子；ND 没有测到产物 L-Asn

2.3.4 有机溶剂对 *LsaAS-A* 酶活的影响

在酶的工业应用中常常会使用到有机溶剂，但是有机溶剂的存在会破坏酶水化层，降低溶液的极性，使酶分子中维系构象的次级键被破坏，从而改变酶的构象，使催化活性降低。所以考察有机溶剂对酶活的影响是必要的。如表 4 所示添加 10%以下的乙醇、甲醇和二甲基亚砜（DMSO）酶活力降低 7%以下，但是添加 5%十二烷基磺酸钠（SDS）会导致酶完全失活。

表 4 有机溶剂对 *LsaAS-A* 酶活力的影响  
Tab. 4 Effect of organic solvents on the activity of *LsaAS-A*

有机溶剂	相对酶活/%
对照	100
5%乙醇	98.32
10%乙醇	94.02
5%甲醇	96.86
10%甲醇	93.25
5%DMSO	97.00
10%DMSO	93.72
5%SDS	ND
10%SDS	ND

注：对照：不添加有机试剂；ND 没有测到产物 L-Asn

2.3.5 *LsaAS-A* 的动力学参数

按照 1.3.6 的方法测定不同底物浓度的反应初速度，根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图。如图 7 所示，直线在横轴上的截距为-1/*K<sub>m</sub>*，纵轴截距为 1/*V<sub>max</sub>*，计算可以得到表 5 所得的 *K<sub>m</sub>*、*V<sub>max</sub>*。如表 5 所示，*LsaAS-A* 对 Asp 的 *K<sub>m</sub>* 为 0.78 mM，与来自 *Klebsiella aerogenes* 的 AS 相近<sup>[20]</sup>，说明 *LsaAS-A* 对 Asp 的亲合力高。*LsaAS-A* 对 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的 *K<sub>m</sub>* 为 6.5 mM，与来自 *Streptococcus bovis* 的 AS 相近<sup>[21]</sup>。*LsaAS-A* 对于 ATP 的 *K<sub>m</sub>* 为 2.24 mM，*K<sub>m</sub>* 值较小，说明对 ATP 的亲合力较大，在实际催化反应中只需少量 ATP 就可顺利进行反应。

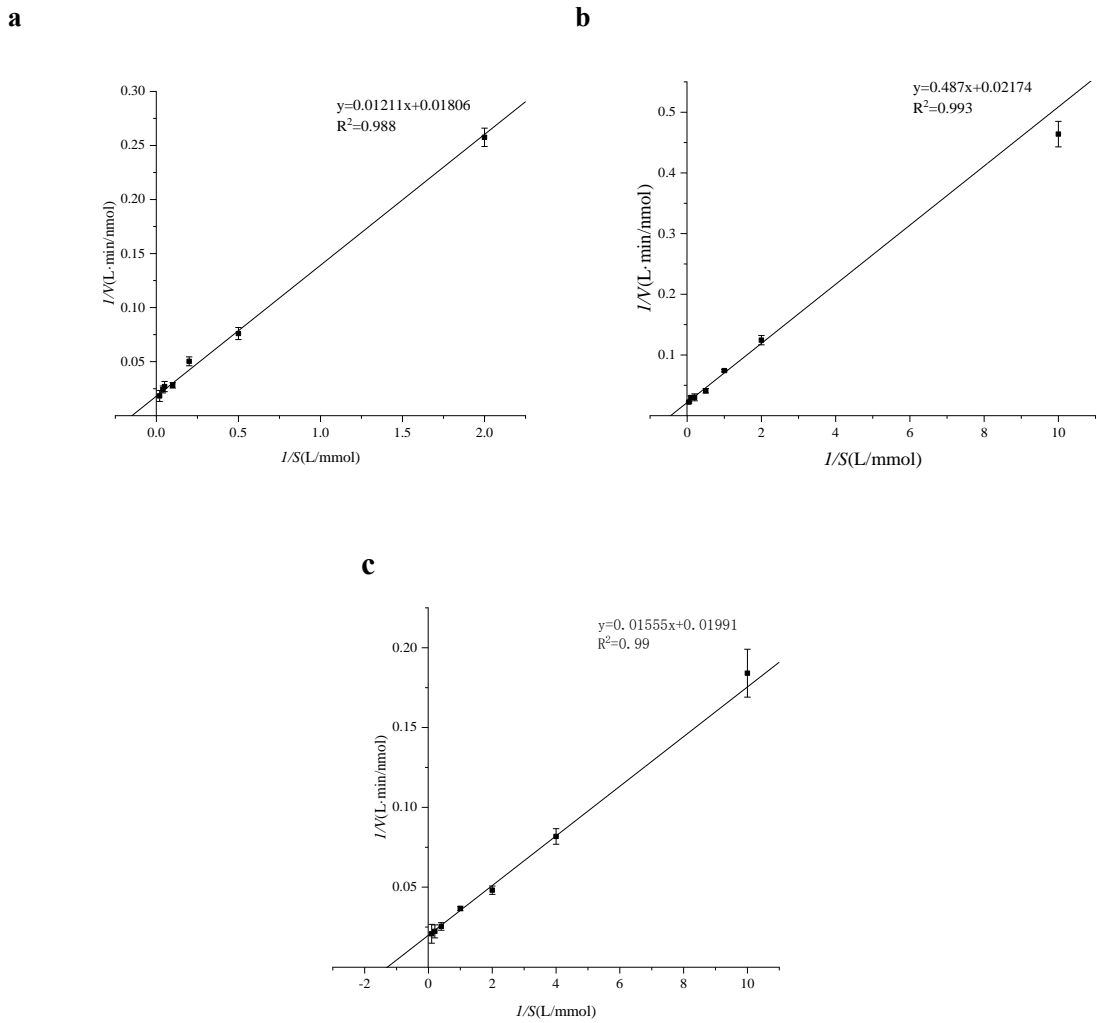


图 7 *LsaAS-A* 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig. 7 Linesaaver-Burk double reciprocal curve of *LsaAS-A*

注：a 以 Asp 为变量的双倒数曲线；b 以  $\text{NH}_4^+$  为变量的双倒数曲线；c 以 ATP 为变量的双倒数曲线

表 5 *LsaAS-A* 的动力学参数  
Tab. 5 Kinetic parameters of *LsaAS-A*

Substrate	$K_m$ /mM	$V_{max}/(\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1})$
Asp	0.78	50.22
$\text{NH}_4^+$	6.5	53.76
ATP	2.24	46.00

### 3. 结论

天冬酰胺在医药、化工、微生物培养等方面有着重要的作用，生物法生产天冬酰胺相对于化学法和植物提取法有一定的优势。为了筛选更适合工业生产的生物催化剂，本文利用基因挖掘技术，表达了 8 种有活性的不同生物来源天冬酰胺合成酶，其中以大肠杆菌为宿主表达了 4 种，以枯草芽孢杆菌为宿主表达了 6 种，其中酶活力最高的是以枯草芽孢杆菌为宿主的 *LsaAS-A*，发酵液的酶活力为 1.356 U/mL。研究了 *LsaAS-A* 的酶学性质：该酶最适温度 41℃，最适 pH 为 8.0；在 30℃，pH 为 8 的缓冲液中的半衰期为 857.85 min，在 pH 为 5 的

缓冲液中 4℃保存 24 h 剩余 99.43%酶活; 该酶为金属依赖性酶, 不添加金属离子没有酶活, 常见的金属离子中  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 可以激活酶的活性, 其中添加  $Fe^{2+}$ 酶活最高; 低浓度的有机溶剂对酶活的影响不大, 加入 5%的十二烷基磺酸钠 (SDS) 导致酶完全失活。

动力学分析结果表明该酶对 L-天冬氨酸的  $K_m$  为 0.78 mM, 相应的  $V_{max}$  为 50.22 nmol/(min·mg), 对于  $NH_4^+$  的  $K_m$  为 6.5 mM,  $V_{max}$  为 53.76 nmol/(min·mg), 对于 ATP 的  $K_m$  值为 2.24 mM,  $V_{max}$  为 46.00 nmol/(min·mg)。天冬酰胺合成酶基因的成功表达为 L-天冬酰胺的生物合成提供了可能。

## [参考文献] (References)

- [1] 施志浩, 魏运洋, 周莉萍, et al. 天冬酰胺丙酮叉在多肽合成中的应用[J]. 应用化学, 2007, (06): 109-113.
- [2] BUNEV A S, RUDAKOVA Y I, PEREGUDOV A S, et al. Synthesis of thiazole-containing amino acids based on asparagine[J]. Russian Chemical Bulletin, 2014, 65(5): 1232-1234.
- [3] 张维燕, 刘亚亚, 刘旭平, et al. 谷氨酰胺和天冬酰胺对 CHO 细胞生长、代谢及抗体表达的影响[J]. 2014, 34(4): 9-15.
- [4] ECHAVARRIA A P, PAGAN J, IBARZ A. Antioxidant activity of the melanoidin fractions formed from D-Glucose and D-Fructose with L-Asparagine in the Maillard reaction[J]. Scientia Agropecuaria, 2013, 4(1): 45-54.
- [5] GARG N, BERA S, RASTOGI L, et al. Synthesis and characterization of L-asparagine stabilised gold nanoparticles: Catalyst for degradation of organic dyes[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 232.
- [6] SAFARI J, SHOKRANI Z, ZARNEGAR Z. Asparagine as a green organocatalyst for the synthesis of 2-aminothiazoles[J]. Polycyclic Aromatic Compounds, 2018,10: 1040-1048.
- [7] 詹谷宇, 叶明, 田萍. 从草木樨芽提取天门冬酰胺[J]. 氨基酸和生物资源, 1984(2): 6-8.
- [8] 宁健飞, 蔡立明, 陈晓双. 一种 L-天冬酰胺的制备方法[P]. 中国, 201810705750, 2018-07-02.
- [9] 马江权, 冷一欣, 杨利民, et al. D L-天冬酰胺合成工艺研究[J]. 精细化工, 2000(2): 112-114.
- [10] SUGIYAMA A, KATO H, NISHIOKA T, et al. Overexpression and purification of asparagine synthetase from *Escherichia coli*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1992, 56(3): 376-379.
- [11] GAUFICHON L, MICHELE R, ROTHSTEIN S J, et al. Biological functions of asparagine synthetase in plants[J]. Plant Science, 2010, 179(3):141-153.
- [12] MANHAS R, TRIPATHI P, KHAN S, et al. Identification and functional characterization of a novel bacterial type asparagine synthetase A: A tRNA synthetase paralog from *Leishmania donovani*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(17):12096-12108.
- [13] 张奇, 张露, 徐友强, et al. 生物转化法制备 L-天冬酰胺[J]. 中国生物工程杂志, 2016(1): 63-67.
- [14] 张奇, 姜增妍, 张露, et al. "一锅法"生物转化富马酸制备 L-天冬酰胺[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(8): 57-60.
- [15] 马江锋, 姜岷, 董维亮, et al. 一株高效转化延胡索酸为 L-天冬酰胺的重组大肠杆菌及其构建方法与应用[P]. 中国, 201610430229.8, 2016-06-16.
- [16] CEDAR H, SCHWARTZ J H. The Asparagine synthetase of *Escherichia coli*[J]. Biological Chemistry, 1969, 244(15): 4122-4127.
- [17] HUMBERT R, SIMONI R D. Genetic and biochemical studies demonstrating a second gene coding for asparagine synthetase in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1980, 142(1): 212-220.
- [18] 王健. 金属离子对酶功能所起的作用[J]. 宜宾学院学报, 1993, (2): 65-71.
- [19] RICHARD N G J, SCHUSTER S M. Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis[J]. Advances in enzymology and related areas of molecular biology, 1998, 72(1): 145-198.
- [20] REITZER L J, MAGASANIKA B. Asparagine synthetases of *Klebsiella aerogenes*: properties and regulation of synthesis[J]. Journal of bacteriology, 1982, 151, 1299-131.
- [21] JAMES J, BURCHALL, E C R., WOLIN M J. Purification and Properties of the Asparagine Synthetase of *Streptococcus bovis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1964, 239, 1794-1798.