

循环水物料泄漏时酶工程的应用

（传染性毒蛋白的自复制）

（南京大学化学系 2001 级 刘昕 210089）

（江苏苏宁新技术应用研究所 杨政宏 210013）

[摘要] 酶工程中传染性毒蛋白的自复制在循环水物料泄漏时的应用，介绍传染性毒蛋白（Prion）的自复制原理在循环水的物料泄漏时起到的净化效果。该原理同时被用于污水回用的新工艺中。本文将报道其应用思路和部分工业化效果。

[关键词] 循环水 物料泄漏 污水回用 Prion 自复制 抗体酶

引言

为什么疯牛病能够肆虐，为什么它的治病因子如此难以杀活，它的治病机理是什么？人类是否可以将这一机理加以应用从而造福人类？下文将加以阐述和介绍。

Prion 自复制机理

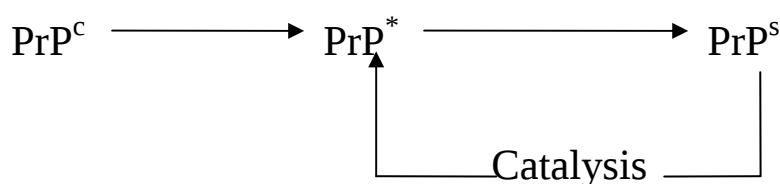
疯牛病在 1986 和 90 年代初期肆虐于英伦，造成了上百万头牛和 40 多位年轻人的死亡^[1]，它的致病因子便是传染性毒蛋白（Prion）的一种。Prion 之所以能造成如此大的损失，是因为它是一种新的病原体，目前尚不完全明白其致病机理，更无可靠的治疗手段。现在，人们知道由 Prion 引起的疾病还有很多，如 Kuru 病，Gerstmann-Strausser-Scheinker 症、Fatal、Familiol Insonnia 等，它们给人类健康造成了很大危害。

Prion 为什么能有如此强大的危害呢？这是因为它作为蛋白质有许多不同于一般蛋白质的性质，如：它能耐高温、耐蛋白质修饰、抗水解，同时它在一定程度上能抗紫外线照射，而最为奇特的是它竟可以自我复制。

致病性毒蛋白复制的原料是非致病性传染蛋白（Prion Protein (PrP^C))，分

子量 33~35KDa, 广泛存在于正常人体和一些生物体内, 在神经传导, 调节生理节律方面有一定作用, 但它对蛋白酶敏感; 致病性毒蛋白即 PrP^{SC} (羊搔痒症毒蛋白 Scripy PrP) 的分子量为 27~30KDa, 能抗蛋白酶水解。这两种蛋白质氨基酸顺序(一级结构)一样, 相互之间也无化学修饰的不同, 它们产生如此大差异的原因是由于它们的构象上不同。 PrP^{C} 由 4 个 α 螺旋组成, 而无 β 折叠, 而在 PrP^{SC} 分子结构中 PrP^{C} 的 2 个 α 螺旋转变为 4 个 β 折叠。 β 折叠的增加和它们的聚合, 产生了淀粉状纤维沉淀, 可能是引起病变的原因。对于 PrP^{SC} 传染机理, 人们作了种种假设。

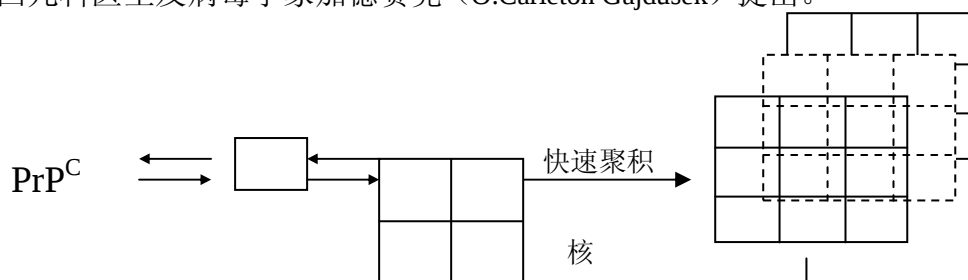
模型一:



由于 PrP^{C} 分子不停振动, 会产生一种部分去折叠的中间过渡态 PrP^* , 外源性 PrP^{SC} 作为一种催化剂或模板, 使 PrP^* 转变为 PrP^{SC} 。 PrP 基因的突变能使 PrP^{C} 更易转化为 PrP^* 。 PrP^{SC} 为不溶性蛋白沉淀, 使反应向右进行。

模型 2:

神经退行性疾病, 病症表现为脑中肽链聚合, 形成淀粉状斑块。当蛋白浓度超过其溶解度时, 淀粉状物便能迅速形成。但这一转变存在一个动力学障碍, 即需要一定的淀粉核存在。 PrP^{SC} 可充当该核种, 促使淀粉状快速积聚。 PrP 的氨基酸突变能增加其对该核种之间的亲和力, 使蛋白质容易发生沉淀。这一理论首先由美国儿科医生及病毒学家加德赛克 (O.Carleton Gajdusek) 提出。



但是也应当指出, PrP^{SC} 仅仅可以促成一级结构相同的 PrP^{C} 向 PrP^{SC} 的转变, 不能促成一级结构不同的其它蛋白质的转变。但是其它一些蛋白质具有将不同一级结构的蛋白质转化成它本身的能力, 如: 胰蛋白酶可以将原来不具有催化活性的胰蛋白酶原的 N-末端剪去一个六肽 (Val-Asp-Asp-Asp-Lys), 从而生成具有相同结构和催化能力的胰蛋白酶。蛋白质的自复制理论在 1967 年由英国人 Gtiffth.J.S 提出^[2], 如今再考虑到 Prion 等的自复制事实, 确实有几分道理。以现代分子酶学的角度来看, 蛋白质的自复制可能是蛋白质自剪接的一种特殊表征。早在 1994 年 Peler 等对蛋白质剪接进行了规范化定义和命名: (1) 将正确阅读框架插入到前体蛋白氨基酸序列中, 但在蛋白剪接成熟过程中被切除的蛋白质内含肽

(intein), 处于 intein 两侧, 其相互首尾相连而产生成熟蛋白产物的蛋白序列称为蛋白外显肽 (extein); (2) 蛋白质剪接是在蛋白质水平上, 而不是在 RNA 水平上进行的。蛋白质剪接是从前体蛋白内切除 intein, 并将 extein 以肽键连接, 产生成熟蛋白质的过程, 切除 intein 和连接 extein 二者缺一不可^[3]。从已知的 Prion 自复制过程分析, 这完全符合 Peler 等对蛋白质剪接的定义。而且, 蛋白质的自复制现象并非是 Prion 所独有的, 在自然界中有广泛存在。

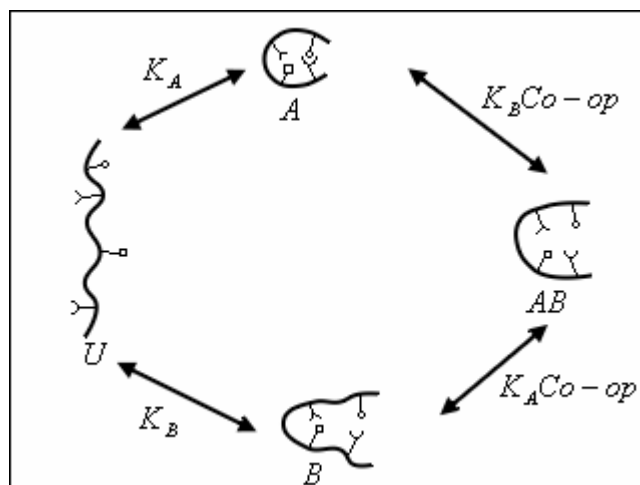
物料泄漏时酶工程的应用实验及原理分析

微生物来源的酶已在工业过程中广泛应用, 通常工业微生物酶制剂主要通过微生物的分离培养与纯化获得。通过筛选也获得了一些特殊工业过程如高温环境、高盐环境、有毒介质环境以及非水相环境等特定环境中应用的若干微生物酶。但这些酶仍存在着适用条件狭窄, 易失活等缺点, 而且研制周期较长, 制造成本较高。现代蛋白质工程技术虽然可以创造全新蛋白质酶, 但仅适用于那些结构已被解析的蛋白质家族的蛋白质, 并且对蛋白质一级结构的改变, 往往会同时带来对靶酶结构和功能的负面影响。而且这种酶产品的成本一般都存在着成本过高的问题, 而且使用量较大的问题也没有得到解决, 进而极大地限制了这类酶产品的应用。那么, 能否将 Prion 的自复制性和高稳定性“移植”到酶工程中去, 使获得的酶制品不但能够保持活性, 而且可以自我复制, 从而大大降低使用量。实现这一过程的核心是解决自复制的工业化问题。这时, 酶的结构域理论给了我们启发。

在八十年代初, 美国普渡大学的罗斯曼教授在研究乳酸脱氢酶的晶体结构中发现乳酸脱氢酶中与辅因子结合的部分与其它脱氢酶中的部分结构类似。这其中最引人注目的是这种结构类似性并不总出现在分子相关的部分, 这似乎说明在进化过程中这部分结构在蛋白质序列中移动并保持与辅因子结合的活性。他提出蛋白质是由模块(可以称之为结构域)构成的, 这些模块在生命早期形成, 并有不同的组合形式。他的发现为蛋白质自复制进行提供了一种可能, 如果酶可以通过若干部分的组合生成, 那么酶完全有可能具备类似“半保留复制”的机理。罗斯曼的建议已经得到了实践的肯定。不但现在实验已发现许多大蛋白质序列的重复结构组成(纤维连接蛋白(fibronectin)), 而且已在实验内完成了受控分子进化(最初由美国伊利诺大学的斯比戈曼教授于 60 年代实现)^[5]。我们在这里受化学进化理论启发, 把一组酶放入模拟底物环境, 但采取措施使其处于激发态(鲍林与 1946 年阐明酶催化活性的实质是与底物的激发态而非基态结合), 寄希望会发生类似多种群生物共栖一处而引起的共同进化, 物种融合的现象。而且由于蛋白质是大分子物质, 涉及因素远较一般生命系统为少, 因此这种进化是有可能在可控时间、条件下完成的。

在实际“驯化”过程中, 多物种混合酶系与底物环境长期共存, 明显增强了酶的催化活性。并且, 某一种原始态混合酶群在不同底物环境下经过一定时间的“驯化”, 明显出现了不同于原始状态的催化专一性。而且, 如果把经过驯化的酶群在放入类似但不同的底物环境中它也能进一步“进化”可以达到将原始态混合酶群直接“驯化”所得到的效果, 甚至更好(这可能是由于驯化时间明显加长的结果)。这说明, 酶的“驯化”和酶的催化过程是热力学可逆过程,。

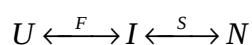
究其原因，可能是由于在发生蛋白质折叠与去折叠动态平衡中，蛋白质去折叠，自主打开三级结构，但保持二级结构的绝大多数 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角，自主卷曲成为一个质地较为松散球状物而形成亚稳态结构(类似的情况已在对枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)和 α 二裂解蛋白酶(α -lytic protease)的研究中得到了证实)。在这种亚稳态结构中由于部分分子内氢键变弱甚至断开，体积约比



图一

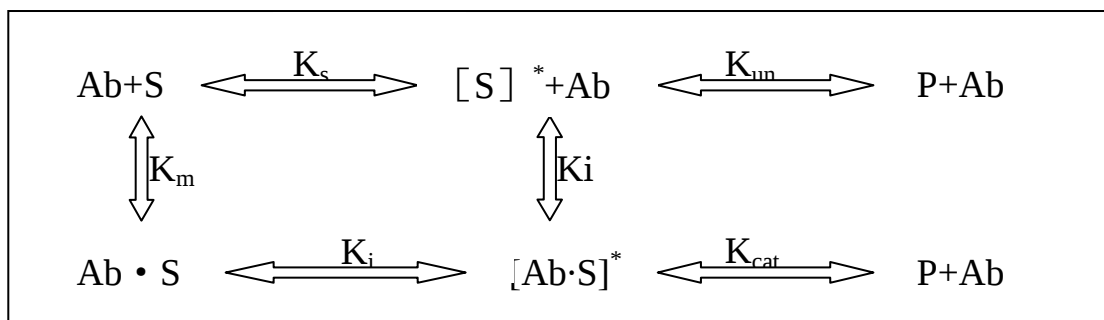
原态增大 10%，而这种结构由于原有氢键已断裂，在介质条件下受极性溶剂——水的影响，肽链侧链修饰基团极化。这使熔球体处于热力学不稳定状态，易于聚合。聚合的过程中并非一个物种的聚合，而是多个酶种互相融合形成新的复杂聚合物（以上是最简单的单肽链自聚合的示意图）。

此时，由于底物环境的影响，聚合物的酶原剪去部分多余肽段，在底物的化学修饰下形成不同的支链通过特定的动力学途径形成不同的“熔球体”(molten globule)。而生成的一些“新酶”在新加入的前体肽链作用下结合折叠生成更新的酶，底物在这里起类似分子伴侣(molecular chaperone)帮辅新生成肽链折叠，获得活性；同时，有可能发生正价修饰。一旦这种新酶产生，其余熔球体，以它为模版复制。它在理论上存在如下动力学模型。这在动力学上是一个多相过程(用多个一级动力学方程描述，有多个速度常数)



U: 原蛋白质 I: 中间体 N: 新生成蛋白质
F: 快相(Fast Phase) S: 慢相(Slow-Phase)

事实上，我们在这里得到的产品非一般意义上的酶，而是抗体酶(abzyme)。它的催化动力学研究表明，它具有动力学饱和特征。所有抗体酶均遵守 Michaelis-Menten 速度表达式。



图二

K_m :催化速度达最大速度一半时的底物浓度,也可近似表达抗体酶—底物复合物解离常数。

K 代表抗体酶被底物饱和条件下的产物生成速度常数。

K_i 是底物—抗体酶复合物过渡态解离常数。

K_{cat} 代表在抗体酶被底物饱和条件下的产物生成速度

K_{un} 代表没有抗体酶存在的速度常数

K_{cat}/K_{un} 可表征相同反应再加入抗体酶后速度增大程度。

K_{un}/K_{cat} 可表征底物和抗体酶开始结合至最高能量过渡态所需克服的能量。

基于稳态动力学分析和理论计算可以得出以下关系式

$$K_s/K_t \equiv k_m/k_i \equiv K_{cat}/K_{un}$$

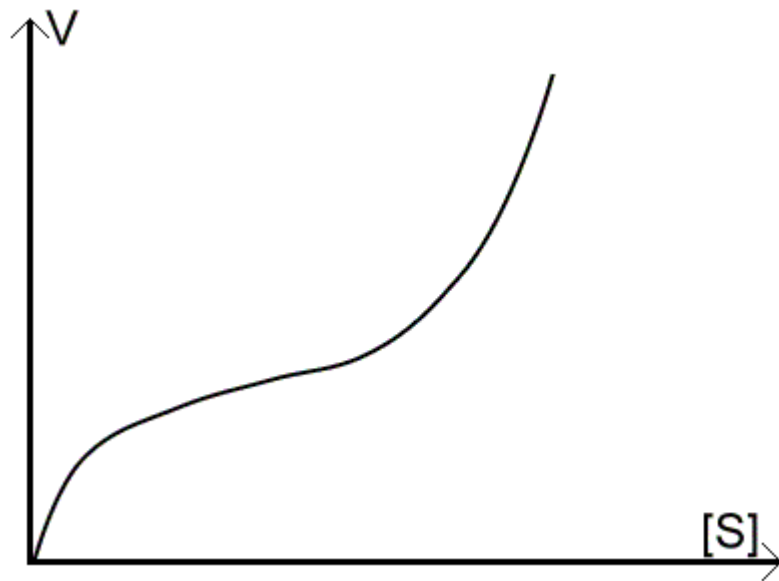
酶量过多时产生可逆性混合抑制,理论上讲,抗体酶的催化高效主要来自四个方面: 1.稳定过渡态; 2.熵阱效应; 3.催化基团作用; 4.辅基参与。工业品抗体酶在这样方法均有较佳体现,在制造的这种酶系的过渡态中,由于是多物种酶相互缠绕、结合的产物,所以过渡态分子(类似于“驯化”过程中的熔球体)具有较多的隐藏催化基团,具有较多的催化方向可能性,并遵循多步“乒乓机制”,催化效率(比活度)可达 10^6 , 并且诱导方向选择性较弱,过渡态分子的各种催化方向很可以得到较充分地发展。在系统正常工作无明泄漏时,底物过少,酶系中的蛋白水解酶发挥作用,水解掉大部分的酶,在平衡后保留部分具自复制能力的中间体,一旦发生泄漏有底物出现,酶会迅速增殖。由于底物处于激发态,抗体与底物进入激发态后产生复合的结合能,可有效“冻结”其转动自由度和平动自由度,从而降低形成活化复合物的必要活化熵。在实际应用中一般采取再在系统中加少量活化激活剂的方法诱使蛋白酶激发,其间产生的某种未知产物还可以和抗体酶结合形成辅基,辅助主催化反应顺利进行。

物料泄漏时酶工程的应用实例

这种产品是面向冶金和石油炼制行业,用以循环水系统发生物料泄漏或在循环水系统中实现污水直接回用时的循环水中矿物质烃类的净化。在实际应用中效果和费用比已经达到了国内领先水平,而且由于采用了自复制技术,克服了酶的流失问题,基本上无失活现象。酶的投入量随使用时间呈指数级数式减少,而且催化效果明显增强。产生如此效能的原因,可能是酶在系统中一旦失活,有其他尚存活性的酶活化中心存在,失活酶以其为模板迅速复制,而由于系统中的底物环境随时间有较大波动,酶的自复制性在环境变化时又表现为自主变化以适应。

在实验中,由于酶系的自复制效应,初始态下反应呈一级反应。在这之后的一定时间内反应遵从米氏方程,有向零级反应过渡的趋势。但由于有新酶生成,反应速率大大加快。最终,酶系的增殖和它对底物的催化反应达到热力学平衡,

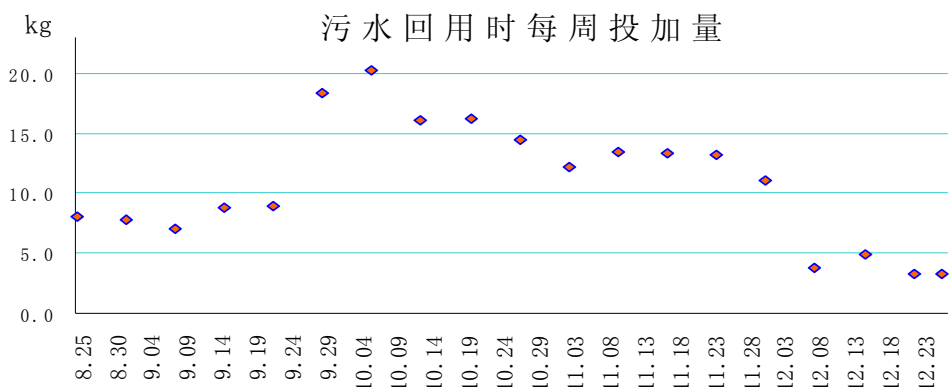
整体体现为反应停止。考虑到在实际使用中酶和底物环境接触时间相对有限，无法完全发生以上过程。反应速率和底物浓度相互关系见图三。



图三

在图三中，反应速率 V 随底物浓度 $[S]$ 增加而呈倒 S 型变化。

在理论推导获得了如上结论，为了验证理论可信度，我们在南方某炼油厂物料泄漏的循环水系统中实施污水回用工程，循环水水体长期被泄漏的物料污染，水质一直不太理想，但通过采用活性酶类药剂及其组合工艺的 CAOT 技术后，使该水体即使在补入的污水中 COD 值大于 100mg/L 时，仍保持稳定的清洁程度。在运行中发现活性酶类药剂的使用量在逐日减少，两个月后降到约 1/10 稳定值，见下图所示。在系统刚刚使用时，使用量不得不逐渐提高，在 9 月 27 日全量使用污水后，经过一段时间的运行，用量成稳定的下降趋势，水质未有恶化表现，在循环水水体中仍能保持高投加量时的净化水平。



图五

另，东部某炼油厂 3[#] 循环水，长期使用活性酶制剂。初期用量很大，月综合运行费近 20 万元，一年后降至 10 万元左右，7000 吨循环水中，每天纯量添加 10g 活性酶制剂，其活性酶制剂的减少量在 95% 以上，净化能力不减。在此背景下，一天下午，装置突发泄漏，涌进一股油性黑色水，来历不明，水中油量无法量化。浊度五小时内迅速由小于 10 度的背景上升到 30 度左右，到

第六小时浊度已达 54 度。此时只追加了纯量 200g 的活性酶制剂，就使进入水体的油污及时得到快速降解，浊度于次日上午已下降到 12 度。如果水系中无自复制体系存在，仅靠 200g 的补充，降解上吨的油品，是无法实现的。

2000 年 10 月 5 日 ~ 15 日 该厂 3# 循环水，10 天泄漏油量 1700 吨，水不浑，当天净化完毕，其间未追加任何活性制剂，只是维持每天 10g 活性酶制剂的纯量添加。如此大的冲击，未对现场产生任何影响。按以往惯例，系统必须进行置换清洗，对系统的冲击性影响会延续几个月。由此显示了活性酶制剂的强大的以一当十的净化活性。活性酶制剂的这种净化潜力，如果没有 Prion 的复制，是很难出现上述能力的。

下面是由某炼油厂提供，在两个循环水场同时使用活性催化剂后其污水处理场的运行状态。现场运行状况相当平稳，效果很好，其显示出该活性酶制剂与环境的亲和性。

时间	pH	含油量	硫化物	挥发酚	C O D	悬浮物	氨氮
97.12.15	7.38	2.10	0.011	0.005	54	14.29	5.82
97.12.16	7.31	1.88	0.009	0.004	40	1.86	5.60
97.12.17	7.42	1.20	0.008	未检出	26	1.31	6.81
97.12.18	7.28	2.63	0.023	0.004	121	7.60	0.97
97.12.19	7.57	1.80	0.019	0.009	47	10.00	0.55
97.12.22	7.42	2.00	0.013	未检出	41	9.60	3.56

在大量的实际应用中，该产品均取得了较佳效果，受到了有关检测部门的认可和用户的好评。在产生多方面贡献的同时，并未出现不利影响，更重要的是也未有病疫发生。这充分表明 Prion 的自复制性的客观存在，且又为 Prion 有利于人类定向自复制的广泛应用提供了有力的事实。

缺点与不足

1. 目前，这种酶的制作方法受初始混和酶系的构成影响较大，如果缺少合适的具有某种催化方向的原始酶，在产品抗体酶中的该功能便无法实现。如对苯二甲酸的直接催化便未能实现。
2. 产品抗体酶是在取出一定底物激发态环境中培养的，这样固然可以提高产品的特异化程度，增强针对性，同时也可以适应系统环境的少量渐变。但移植性不高，在不同的系统环境下无法通用，如在为某特定的炼油厂制造的产品就无法在另外的石化厂使用。
3. 驯化周期较长，致使研发速度较慢，无法满足急需状态的产品供应。

但是，我们相信，随着研究的进一步深入，工业使用的进一步成熟，这些不足都一定能被克服，我们用新方法将做出第一流的产品

参考文献

- [1] Will R G, cousins S N, Farrington C P et al. Death from variant Creutzfeldt-Jakob disease. The lancet, 1999,353:979
- [2] Griffith J S. Nature of the Sciapie Agent. Nature , 1967,215: 1043~1044
- [3] 邹承鲁. 第二遗传密码?——新生肽链与蛋白质折叠的研究,长沙:湖南科学技术出版社,1996 : 150~151
- [4] 郭勇,郑穗平等 酶学 , 华南理工大学出版社, 1994:51
- [5] 唐有祺 生命的化学——生命过程中重要化学问题研究 , 长沙:湖南科学技术出版
社,1996 :58~59