

贻贝过氧化氢酶的纯化及部分性质

林少琴 兰瑞芳 余萍 程蔚 福建师范大学实验中心 福州 350007

摘要 新鲜贻贝肉匀浆抽提液经硫酸铵盐析、DEAE-Sepharose FF柱层析纯化,得到一种过氧化氢酶。该酶为糖蛋白,亚基分子量约为76000,中性糖含量约为10.56%,研究表明,贻贝过氧化氢酶的最佳pH7.0左右,对热不稳定,45℃保温15min,酶的残余活力约为70%;60℃保温15min,则酶的残余活力仅剩10.6%左右。 NaN_3 、KCN及某些金属离子如 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 等抑制酶的活性; Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 则对酶有不同程度的激活作用。

关键词 贻贝 过氧化氢酶 糖蛋白 纯化 性质

Abstract A catalase from fresh *Perna Viridis* had been purified by the use of saline extraction, ammonium sulfate precipitation and DEAE-Sepharose FF column chromatography. It was identified as glycoprotein and the neutral saccharide content of the enzyme was assayed as about 10.56%. The enzyme subunit molecular weight was about 76000 as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The experiment result indicated that the optimal temperature and pH of the enzyme were 35℃ and 7 respectively. The enzyme was not stable in heat and retained 70% of the original enzyme activity after incubation at 45℃ for 15min. It had only 10.6% of the original enzyme activity after incubation at 60℃ for 15min. Its catalytic activity was strongly inhibited by NaN_3 and KCN. The metal ions Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} showed some inhibition and Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} could increase its activity in varying degrees.

Key word *Perna Viridis* Catalase Glycoprotein Purification Properties

过氧化氢酶(Catalase,简称CAT)是广泛存在于需氧动植物及微生物细胞中的一种氧化还原酶,它可以催化过氧化氢分解,生成氧和水。主要功能即是清除生物体内的过氧化氢。在食品工业上,过氧化氢酶可以用来除去多余的过氧化氢,因而可用于果汁保鲜等方面。在葡萄糖氧化酶和葡萄糖的混合体中,它可以作为抗氧化剂用于食品的保鲜^[1]。对多种不同来源CAT研究表明,此酶均含高铁血红素,具有血红蛋白的典型吸收峰,大多数能被KCN、 NaN_3 、巯基化合物等抑制。

贻贝,俗称淡菜,因其含有丰富的营养成分而享有“海洋牛奶”美誉^[2,3]。它还具有滋阴补血、益精补肾、养血调精、消瘦瘤等作用,常用于虚劳、阳萎、肾虚腰痛、久痢贫血、产妇缺乏乳汁等^[4]。是一种有较高药食同源价值海洋贝类生物,综合开发利用的前景十分广阔。

有关贻贝超氧化物歧化酶SOD的研究前文已作报道^[5],本文则介绍贻贝过氧化氢酶的纯化及部分性质。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

新鲜贻贝(*Perna viridis*)购自福州仓山程埔市场; DEAE-Sepharose FF (Pharmacia); 丙烯酰胺、N N甲叉丙烯酰胺(Bio-RAD); 考马斯亮兰R₋₂₅₀、G₋₂₅₀

(Fluka); 次高分子量标准蛋白质(上海丽珠东风生物技术有限公司); 其余试剂均为国产AR或以CP。

全自动高速冷冻离心机GL20A(湘西科仪厂);

751-GW分光光度计(上海分析仪器厂);

1000/500型电泳装置(Bio-RAD)。

1.2 方法

1.2.1 酶的分离纯化:新鲜贻贝去壳取肉,按1:1比例加入生理盐水,匀浆。4℃放置1h,6000r/min离心20min,收集上清液。加入固体硫酸铵至60%饱和度,4℃下静置0.5h,6000r/min离心30min,沉淀用10mol/L PB pH7.6溶解,置透析袋分别用流水、10mol/L PB pH7.6透析至硫酸铵除尽。

将上述粗提酶液上DEAE-Sepharose FF层析柱(16×20cm),先用10mol/L PB pH7.6洗脱至 $A_{240\text{nm}} \leq 0.02$ 止。再改用含有0.05mol/L NaCl、10mmol/L PB pH7.6进行洗脱,流速105ml/h。收集蛋白活性峰,透析脱盐后,用聚乙二醇PEG-600浓缩,备用。

1.2.2 酶活力测定:方法按文献^[6],底物0.067mol/L H_2O_2 溶液控制在 $A_{240\text{nm}}=0.500$ 左右,酶的活力单位定义为在25℃pH7.0条件下每分钟分解1 μmol 过氧化氢所需的酶量。酶活力计算公式: $(E_{240} \times 3) / (0.043 \times E_w) = u/\text{mg}$ 。式中 E_{240} :240nm处每分钟内吸光度的降低值; E_w :每0.1ml所用酶液中含酶量(mg);0.043:240nm处1 μmol H_2O_2 吸光度;3:反应混合液总体积。

1.2.3 蛋白质浓度测定:采用考马斯亮兰G₋₂₅₀染色法

[7], 以牛血清白蛋白作标准。

1.2.4 酶纯度的检测: PEGE 法, 凝胶用考马斯亮兰 R₂₅₀ 染色。

1.2.5 酶的活性染色鉴定: 按参考文献[8]的方法操作, 电泳凝胶经活性染色后, 背景为蓝绿色, 有CAT活性的部分呈透明亮黄色。

1.2.6 糖蛋白鉴定及中性糖含量的测定 聚丙烯酰胺凝胶电泳后按参考文献[9]的方法进行糖蛋白染色, 用苯酚 - 硫酸法测其中性糖含量。

1.2.7 亚基分子量的测定: SDS-PAGE 实验方法, 采用次高分子量标准蛋白质 (Mr: 43000~200000)。

2 结果与讨论

2.1 贻贝 CAT 的分离纯化与鉴定

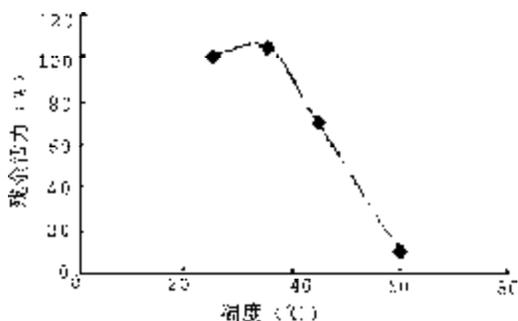
鲜活贻贝肉经匀匀抽提, 60%硫酸铵沉淀及DEAE-Sepharose FF 柱层析纯化, 得到贻贝CAT样品。经不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果呈现单一蛋白区带, 表明该酶已纯化到匀一程度; 同时酶的活性染色结果呈现一条亮黄透明的活性带, 且与酶蛋白染色带位置一致。糖染色实验, 染色后蛋白带呈桃红色, 表明贻贝CAT为糖蛋白; 苯酚 - 硫酸法测定其中性糖含量约为10.56%。

2.2 酶的部分理化性质

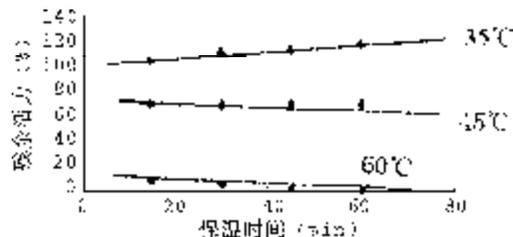
2.2.1 酶的亚基分子量: 将纯化的贻贝CAT进行SDS-PAGE 实验, 以次高分子量标准蛋白质作参照, 测得其亚基分子量约为76000。

2.2.2 酶的最适 pH: 分别在 pH3、4、5……11 条件下, 测定贻贝CAT活性。结果表明 pH<5、pH>9 时酶活性很低, 最适 pH5~9 范围内, 最佳 pH7.0 左右。

2.2.3 酶的热稳定性: 贻贝CAT在不同温度(25~60℃)、保温不同时间冷却至室温, 测定其相对酶活。结果表明, 贻贝CAT的最适温度为35℃, 在此温度下其酶活达最大值; 对热较不稳定, 45℃保温15min, 酶活下降30%, 60℃保温15min, 酶的残余活力仅为10.6%



A 不同温度下保温15min 酶活力变化



B 不同温度下保温不同时间酶活力变化

图1 温度对贻贝CAT活性的影响

左右; 保温45min, 酶活几乎全部丧失。结果见图1。

2.2.4 Na₃N、KCN对贻贝CAT的抑制作用: Na₃N、KCN对贻贝CAT有强烈的抑制作用。4 × 10⁻³mmol/L Na₃N以及1mmol/L KCN即能使其CAT活性100%丧失。结果见图2、图3。

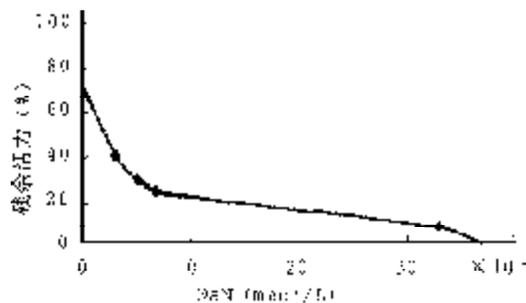


图2 Na₃N对贻贝CAT活性的影响

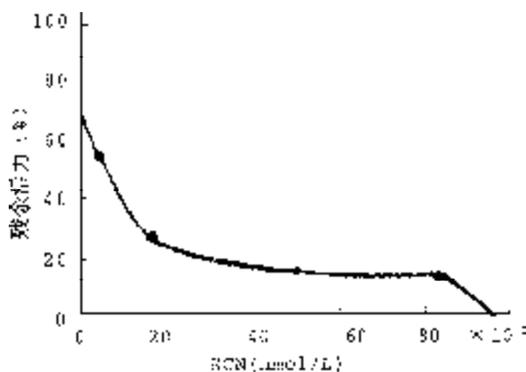


图3 KCN对贻贝CAT活性的影响

2.2.5 金属离子对贻贝CAT的作用: 见表1。实验结果表明, 在相同浓度下, Zn²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺对酶不同程度的激活作用; 而Pb²⁺、Hg²⁺、Fe²⁺、Cd²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺

表1 各种金属离子对贻贝CAT活性的影响

金属离子 M ²⁺	相对活性 (%)	金属离子 M ²⁺	相对活性 (%)
Pb ²⁺	57.6	Cd ²⁺	62.7
Fe ²⁺	86.7	Zn ²⁺	122.2
Cu ²⁺	120.5	Hg ²⁺	76.9
Ni ²⁺	94.6	Mn ²⁺	67.8
Mg ²⁺	105.4	H ₂ O	100.0

等则对酶有抑制作用。

本实验中贻贝CAT的硫酸铵沉淀粗提物经过DEAE-Sephrose FF柱层析, 纯化了18倍, 活性回收率约为36%。操作步骤简单, 纯化效果较好。贻贝CAT的部分理化性质研究结果表明, 该酶为一糖蛋白, 其糖含量为10.56%, 亚基分子量约为76000。且对热不稳定, 对 NaN_3 、KCN敏感, 在较低浓度 NaN_3 、KCN影响下, 酶活性即受抑制, 这些均是CAT为血红素蛋白的特殊反应。此外各种金属离子对贻贝CAT活性的影响差异较大, Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 等表现为抑制酶的活性, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 则对酶有不同程度的激活作用, 其复杂的作用机制及原理有待于进一步研究。

参考文献

1 Barmann, T.E: Enzyme Handbook. Springer, Berlin, 1985.

- 侯文璞等. 贻贝的营养价值. 食品科学, 1985, 12(1): 13.
- 汪秋宽. 贻贝扇贝废弃物的深加工综合利用. 生物工程进展, 1996, 16(6): 54.
- 俞振良等. 紫贻贝水提取物对大鼠离体子宫平滑肌的作用. 中国海洋药物, 1994, 13(3): 15.
- 林少琴等. 贻贝(*Perna Viridis*)超氧化物歧化酶的纯化及部分性质研究. 天然产物研究与开发, 1999, 11(4): 25.
- 蒋似葵等. 工具酶的活力测定. 上海: 上海科技出版社, 1982, 37.
- 鲁子贤主编. 蛋白质和酶学研究方法(第二册). 北京: 科学出版社, 1989, 37.
- 董泗建等. 一种鉴定过氧化氢酶活性的铁染色法. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(1): 86.
- Zaccharias RM. Zell TE Momison JH. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. Anal Biochem, 1969, 30(1): 148.

非肌肉蛋白对鲢鱼组织蛋白酶活性的影响

孔保华 东北农业大学 哈尔滨 150030

南庆贤 中国农业大学 北京 100094

摘要 主要研究了大豆蛋白和马铃薯淀粉作为蛋白酶抑制物对组织蛋白酶L的抑制作用, 说明大豆蛋白和马铃薯淀粉可降低组织蛋白酶L活性, 从而提高凝胶强度。

关键词 大豆蛋白 马铃薯淀粉 组织蛋白酶

Abstract This paper studied the inhibition effect of soybean protein and potato starch on cathepsins L. The results showed that soybean protein and potato starch could decrease the activity of cathepsins L strongly but increase the gel strength.

Key words Soybean protein Potato starch Cathepsins

非肌肉蛋白质已被广泛应用于鱼糜制品, 以增加鱼糜的凝胶强度, 蛋白添加物是通过抑制内源性蛋白酶活性而起作用的。最常用的蛋白添加物是牛血清蛋白 (beef plasma protein, BPP)、蛋清蛋白 (egg protein)、马铃薯淀粉 (potato starch) 和乳清蛋白浓缩物质 (whey protein concentration)^[4~6]。Hamann et al.^[3]研究表明 BPP 可有效提高大西洋步鱼 (Atlantic menhaden) 和阿拉斯加绿鳕 (Alaska Pollock) 鱼糜的凝胶强度, 即使在凝胶劣化温度放置一段时间, 仍能提高凝胶强度, 他们认为这是由于抑制了蛋白酶的活性而起的作用。Wasson. et al.^[8]发现 BPP 和鸡蛋清蛋白能提高凝胶强度。Morrissey^[10]表明在太平洋牙鳕中, BPP 比蛋清蛋白和马铃薯淀粉对蛋白酶的抑制更有效。Akazawa et al 证明 BPP 比乳清蛋白和马铃薯淀粉在高浓度时可替代 BPP。Reppond^[6]表明在鱼糜中添加2%的马铃薯淀粉、乳清蛋白和蛋清

蛋白能显著提高凝胶强度。Weerasing^[9]用 BPP、蛋清蛋白和马铃薯淀粉作为太平洋牙鳕蛋白酶的抑制剂, 表明它们对蛋白具有很好的抑制作用, 蛋清蛋白能使胰蛋白酶 (trypsin) 活性减少 90%。尽管提高凝胶强度方面添加蛋白酶抑制物可以起到显著的作用, 但最近研究表明, 转谷氨酰胺酶可用于提高凝胶强度^[7], 但由于价格的原因使它的应用受到限制。从以上论述可知, 关于鱼肉中组织蛋白酶活性及蛋白酶抑制物研究主要集中在海水鱼, 对淡水鱼的研究未见报道; 从以前作者研究表明^[2], 大豆蛋白可提高凝胶强度, 而目前关于大豆蛋白对蛋白酶活性的影响还未见报道。所以本文主要为在鲢鱼鱼糜中添加大豆蛋白和马铃薯淀粉, 研究它们对组织蛋白酶L的活性的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设备