

黄鳍肠道蛋白酶的分离纯化及其性质

江信红, 唐云明

(西南师范大学 生命科学院, 重庆 400715)

摘要:黄鳍(*Monopterus albus* Zuiew)肠道经组织捣碎, 正丁醇脱脂, 硫酸铵分级沉淀, DEAE-Sephacryl 离子交换层析和 Sephacryl S-200 凝胶过滤, 得到蛋白酶纯品。经等电聚焦电泳和 SDS-PAGE 均显示为单一一条带。酶的等电点为 6.2, 最适温度为 55℃, 最适 pH 值为 10.5, K_m (酪蛋白) 值为 5.5×10^3 mg/L。用 SDS-PAGE 和 Sephacryl S-200 测得其分子量分别为 26 kD 和 25.5 kD。酶的 pH 稳定性较好, 在 pH 12 时室温保持 5 h, 活力还剩 55%。NBS, BrAc, TNBS, PMSF 对酶有很强的抑制作用, 而 PCMB, ME 对酶活性影响不大。 Ca^{2+} 对酶活性无激活作用, Mg^{2+} 和 K^+ 对酶活性有轻微抑制作用, EDTA 对酶活性有很强的抑制作用, Na^+ 对酶活性无影响。

关键词:黄鳍; 蛋白酶; 分离纯化

中图分类号: Q959.482 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)03-0329-07

黄鳍(*Monopterus albus* Zuiew)是一种重要的特种水产经济动物, 其肉质鲜美, 营养丰富, 是滋补佳品^[1]。黄鳍肠道蛋白酶的相关研究可为黄鳍饲养的饲料配给提供相关信息, 也可为一直作为下脚料的黄鳍肠道的合理回收利用提供理论基础。蛋白酶是现在市场上需求最大的 3 种酶之一, 在食品、医药、化工及皮革制造等诸多方面有广泛的应用^[2]。可是到目前为止, 还未见黄鳍肠道蛋白酶分离纯化和性质研究方面的报道。本研究对黄鳍肠道蛋白酶进行分离纯化, 并对其基本性质、抑制剂及金属离子对黄鳍蛋白酶活力的影响等方面进行了研究, 旨在为该酶的进一步开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄鳍购于重庆北碚鲜鱼市场。

DEAE-Sephacryl, Sephacryl S-200 凝胶、核糖核酸酶 A、糜蛋白酶原 A、卵白蛋白、牛血清白蛋白、醇酞缩合酶、蓝色葡聚糖 2000 和等电点标准品等为 Amersham Pharmacia 产品; 丙烯酰胺为 Serva 产品; 蛋白质 SDS-PAGE 标准品为上海普洛麦格生物产品有限公司产品; 十二烷基磺酸钠和四甲基乙二胺

为 BDH 产品; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液制备 取黄鳍肠道, 剪开肠道后, 用消毒双蒸馏水洗去血迹和异物。用滤纸吸去水并称重。按 1:2 加入预冷的 Tris-HCl (pH 7.1, 0.05 mol/L) 缓冲液, 用高速组织捣碎机捣碎, 4℃ 抽提 1 h, 离心 (8000 g, 4℃, 30 min), 上清液中加入预冷的正丁醇至终质量分数 25%, 搅匀后置冰箱 4 h, 再离心去沉淀; 收集上清液加硫酸铵至 5% 饱和度, 离心去沉淀, 再于上清液中加入硫酸铵至 50% 饱和度, 离心收集沉淀, 溶解后透析得粗酶液。

1.2.2 蛋白酶的分离纯化

(1) DEAE-Sephacryl 离子交换层析 经处理后的 DEAE-Sephacryl 层析柱用 Tris-HCl (pH 7.6, 0.05 mol/L) 缓冲液平衡。取粗酶液 10 mL 上柱, 用 0~1 mol/L NaCl 溶液 (含 0.05 mol/L, pH 7.6, Tris-HCl 缓冲液) 进行线性梯度洗脱。流速 30 mL/h, 5 mL/管, 紫外检测波长为 280 nm。测定各管洗脱液的蛋白酶活性与蛋白质含量, 收集蛋白酶活性峰, 透析, 冷冻干燥备用。

(2) Sephacryl S-200 凝胶过滤 Sephacryl S-200 凝胶装柱后用 Tris-HCl (pH 7.6, 0.05 mol/L) 缓冲

收稿日期: 2004-09-17; 修订日期: 2004-11-06。

基金项目: 重庆市委资助 (2003-7852)。

作者简介: 江信红 (1979-), 女, 硕士, 研究方向: 酶与酶工程。E-mail: ronzijing@swnu.edu.cn

通讯作者: 唐云明。Tel: 023-68399122。E-mail: thright@swnu.edu.cn

液平衡,用上述离子交换所得活性峰样品上柱,用 Tris-HCl(含 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L, pH 7.6) 缓冲液洗脱, 15 mL/h, 2.5 mL/管, 测定各管洗脱液的蛋白酶活性与蛋白质含量, 收集蛋白酶活性峰, 透析(对双蒸馏水), 冷冻干燥得蛋白酶纯品。

1.2.3 蛋白酶活性测定 以酪蛋白为底物, 取 2×10^4 (mg/L) 酪蛋白 1 mL, 加入 3.9 mL Tris-HCl (0.2 mol/L, pH 7.1) 缓冲液, 于 37℃ 恒温水浴预热 5 min, 再加入蛋白酶液 0.1 mL 反应 20 min, 加 50% 三氯乙酸 (TCA) 终止反应, 离心 (1 000 r/min, 10 min) 后, 上清液于 280 nm 下测其 OD 值, 以先加 TCA 再加酪蛋白为空白。在此条件下每分钟增加 0.001 个 OD 值为一个酶活力单位 (U)^[2]。

1.2.4 蛋白质含量测定 按 Lowry 法^[4] 和分光光度法^[5] 进行测定, 以牛血清白蛋白为标准样品。

1.2.5 等电点及分子量测定 用 Sephacryl S-200 凝胶柱层析和 SDS-PAGE 两种方法测定分子量^[6]。用等电聚焦电泳测定酶等电点^[7]。

1.2.6 蛋白酶的最适温度和最适 pH 值测定 取 0.1 mL 酶液, 在不同 pH 值的缓冲液中反应, 测其相对活性, pH 3~6 为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, pH 7~8 为 Tris-HCl 缓冲液, pH 9~10 为甘氨酸-氢氧化钠, pH 11~12 为氢氧化钠-磷酸氢二钠缓冲液, 温度 37℃。

取 0.1 mL 酶液, 在不同温度下反应并测其活性。

1.2.7 蛋白酶的热稳定性和酸碱稳定性测定 蛋白酶在不同温度和 pH 条件下放置不同时间后, 分

别在 37℃, pH 7.1 条件下测其剩余活性, 以直接在此条件下测得的活性为 100%。

1.2.8 抑制剂、金属离子和 EDTA 对蛋白酶活性影响测定 0.1 mL 酶液中分别加入不同浓度的抑制剂 NBS(N-溴代琥珀酰亚胺), BrAc(溴乙酸), TNBS(三硝基苯磺酸), PCMB(对氯汞苯酸), PMSF(苯甲酰基磺酰氟) 和 ME(巯基乙醇) 以及金属离子 (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+) 和 EDTA 溶液, 在 37℃ 水浴中处理 30 min 后测蛋白酶活性, 以不加抑制剂、金属离子或 EDTA 活力为 100%。空白中加入相同体积的同种抑制剂、金属离子或 EDTA 溶液。金属离子溶液用 0.05 mol/L pH 7.1 的 Tris-HCl 缓冲液配置。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的分离纯化

粗酶液经 DEAE-Sephacrose 离子交换柱后, 所得结果如图 1 所示, 有 2 个蛋白酶活性峰。收集活性高的活性峰的各管洗脱液, 经透析和浓缩后, 再过 Sephacryl S-200 凝胶柱, 所得结果如图 2 所示。纯化后的蛋白酶样品, 经 SDS-PAGE 电泳 (图 9) 和等电聚焦电泳 (图 8) 均显示为一条带, 说明该蛋白酶样品已经达到电泳纯, 整个酶的分离纯化结果如表 1。

2.2 酶的最适 pH 值和最适温度

黄鳍蛋白酶的最适 pH 值测定结果如图 3 所示, 黄鳍蛋白酶在 pH 9~11 时活性较高, 其中 pH 10.5 为最适 pH 值。酶在不同温度下反应, 其活性变化如图 4 所示, 结果表明酶的最适温度为 55℃。

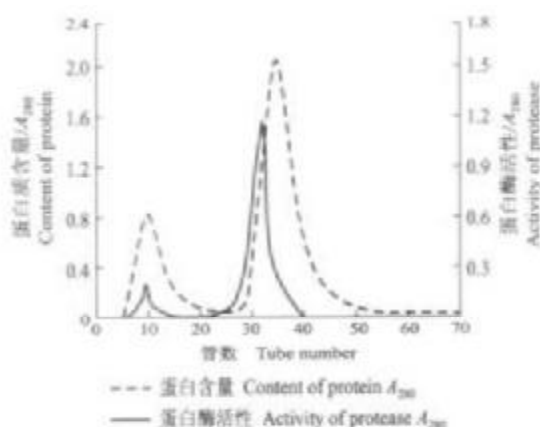


图1 黄鳍蛋白酶的 DEAE-Sephacrose 离子交换柱层析
Fig.1 Column chromatography of protease from ricefield eel on DEAE-Sephacrose.

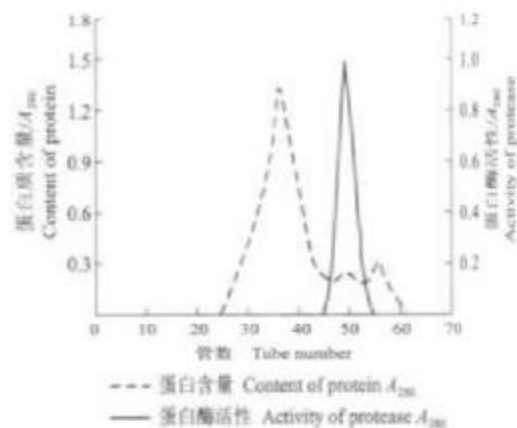


图2 黄鳍蛋白酶的 Sephacryl S-200 凝胶柱层析
Fig.2 Column chromatography of protease from ricefield eel on Sephacryl S-200 gel chromatography.

表1 黄鳍鲷蛋白酶分离纯化结果

Tab.1 Purification results of protease from *Monopterus albus* Zuilow

纯化步骤 Purification step	总蛋白/mg Total protein	总体积/mL Total volume	总活力/U Total activity	比活力 (U,mg ⁻¹) Specific activity	回收率/% Recovery	纯化倍数 Purified times
粗提液 Crude enzyme solution	21 018	236	122 173	5.8	100	1
正丁醇抽提液 Extracting solution by butanol	3 475	165	107 153	30.8	87.7	5.3
硫酸铵盐析 (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	451.1	40	67 500	149.6	55	25.8
DEAE-琼脂糖层析 DEAE-Sepharose chromatography	154	40	34 056	221	27.9	38
S-200 凝胶过滤 Sephacryl S-200 chromatography	8.2	6	12 944	1 580	10.6	272

2.3 酶的热稳定性和酸碱稳定性

蛋白酶的热稳定性和酸碱稳定性测定结果见图5和图6。结果表明,在30℃以下比较稳定,随着温度的升高,酶活力逐渐降低,在55℃时保持1 h酶

活力只剩下不足10%。黄鳍鲷蛋白酶是一种比较耐碱的蛋白酶,在pH 7以上酶活性比较稳定,在pH 12条件下保持5 h,酶活性还保持55%。

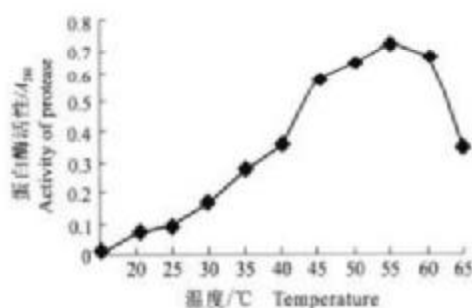


图3 黄鳍鲷蛋白酶的最适反应温度(pH 7.1)

Fig.3 Optimum temperature of protease from ricefield eel(pH 7.1)

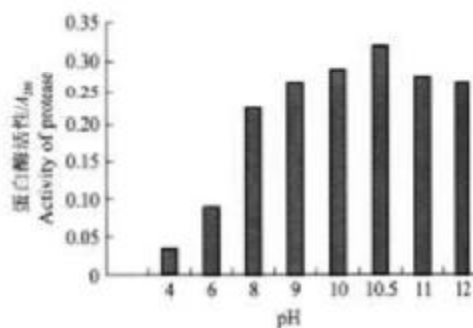


图4 黄鳍鲷蛋白酶的最适反应 pH(37℃)

Fig.4 Optimum pH of protease from ricefield eel(37℃)

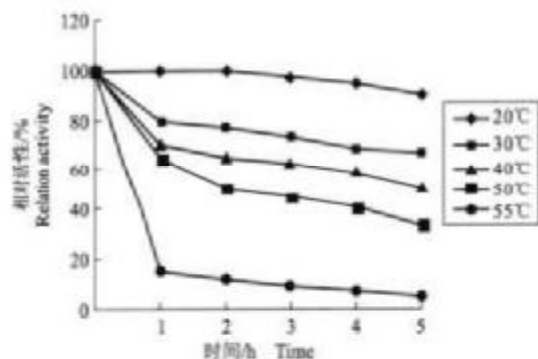


图5 黄鳍鲷蛋白酶的热稳定性(pH 7.1)

Fig.5 Temperature stability of protease from ricefield eel(pH 7.1)

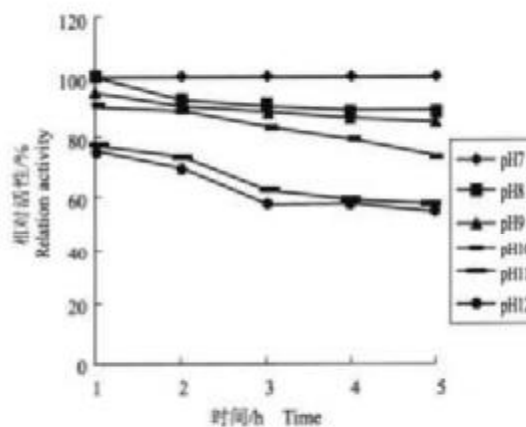


图6 黄鳍鲷蛋白酶的 pH 稳定性(37℃)

Fig.6 pH stability of protease from ricefield eel(37℃)

2.4 蛋白酶的 K_m 值测定

分别以质量浓度(mg/L)为 1.0×10^4 、 5.0×10^3 、 1.25×10^3 、 1.0×10^3 、 8.3×10^2 和 7.14×10^2 的酪蛋白溶液为底物,在 37℃ 下反应,测其活性,以 Lineweaver-Burk 双倒数法作图(图 7),得其 K_m 值为 5.5×10^3 mg/L。

2.5 蛋白酶等电点和分子量测定

经等电聚焦电泳测得黄鳍蛋白酶的等电点为 6.2(图 8)。经凝胶柱层析和 SDS-PAGE(图 9)分别测得酶的分子量分别为 26 kD 和 25.5 kD。

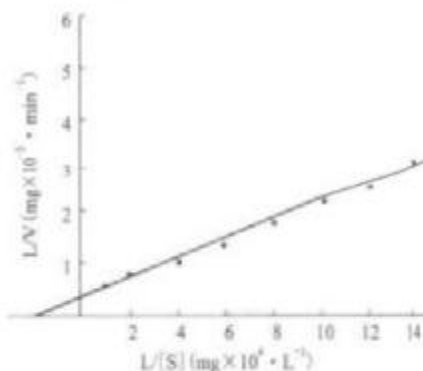


图 7 黄鳍蛋白酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig.7 Lineweaver-Burk plot of protease from ricefield eel



图 8 黄鳍蛋白酶的等电点聚焦电泳测定等电点

1:胰蛋白酶 9.3; 2:扁豆凝集素碱性带 8.65; 3:扁豆凝集素中性带 8.45; 4:扁豆凝集素酸性带 8.15; 5:肌红蛋白(碱性带)7.35; 6:肌红蛋白(酸性带)6.85; 7:人碳酸酐酶 B 6.55; 8:牛碳酸酐酶 B 5.8; 9:β-乳球蛋白 A 5.20; 10:大豆胰蛋白酶抑制剂 4.55; 11:淀粉葡萄糖苷酶 3.50; S:黄鳍蛋白酶 6.2。

Fig.8 Isoelectric point determination of protease from ricefield eel by IEF-PAGE

1:Trypsinogen; 2:Lentil lectin-basic band; 3:Lentil lectin-middle band; 4:Lentil lectin-acidic band; 5:Myoglobin-basic band; 6:Myoglobin-acidic band; 7:Human carbonic anhydrase B; 8:Bovine carbonic anhydrase B; 9:Beta-lactoglobulin A; 10:Soybean trypsin inhibitor; 11:Amylglucosidase. S:Protease of ricefield eel.

2.6 抑制剂、金属离子和 EDTA 对蛋白酶活性的影响

NBS、TNBS、BrAc、PMSF 对黄鳍蛋白酶有很强的抑制作用(图 10~13),浓度分别为 10 μmol/L



图 9 SDS-PAGE 测定黄鳍蛋白酶分子量

1:溶菌酶 14 400; 2:碳酸酐酶 31 000; 3:卵清白 42 700; 4:牛血清白蛋白 66 200; 5:磷酸化酶 b 97 400; P:黄鳍蛋白酶 26 000。

Fig.9 Molecular weight determination of protease from ricefield by SDS-PAGE

1:Lysosyme; 2:Carbonic anhydrase; 3:Ovalbumin; 4:Serum albumin; 5:Phosphorylase b; P:Protease of ricefield eel.

NBS、100 μmol/L BrAc、500 μmol/L TNBS 和 5 μmol/L PMSF 时蛋白酶活性已全部失活,而 PCMB(图 12)、ME(图 11)对蛋白酶活性影响不大,浓度分别为 100 μmol/L、1 000 μmol/L 时酶活性还剩 80%。

蛋白酶液在不同浓度的金属离子溶液处理后测活结果表明, Ca^{2+} 对酶活性无激活作用, Mg^{2+} 和 K^+ 对酶有轻微抑制作用, Na^+ 对酶活力无影响, EDTA 对酶活力有很强的抑制作用(表 2)。

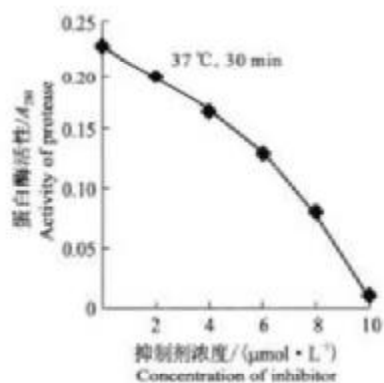


图10 NBS对黄鳍蛋白酶的抑制作用

Fig.10 Inhibition of NBS on protease activity from ricefield eel

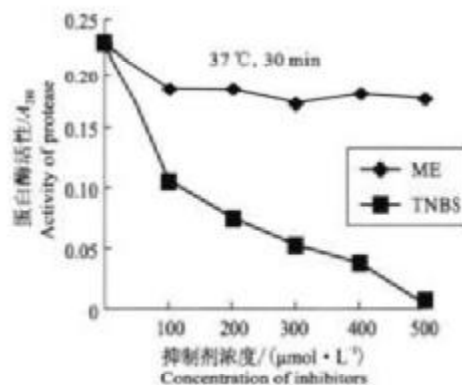


图11 ME和TNBS对黄鳍蛋白酶的抑制作用

Fig.11 Inhibition of ME and TNBS on protease activity from ricefield eel

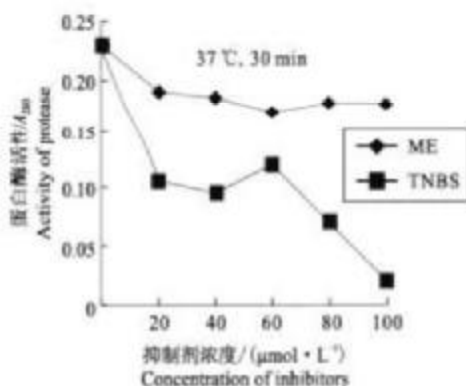


图12 PCMB和BrAc对黄鳍蛋白酶的抑制作用

Fig.12 Inhibition of PCMB and BrAc on protease activity from ricefield eel

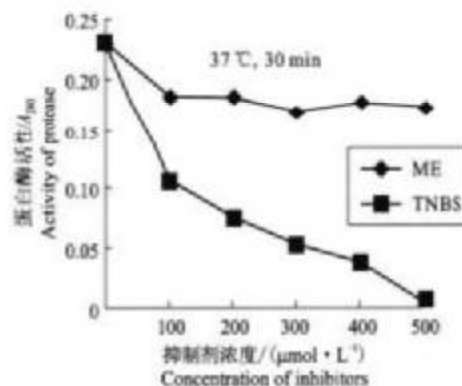


图13 PMSF对黄鳍蛋白酶的抑制作用

Fig.13 Inhibition of PMSF on protease activity from ricefield eel

表2 金属离子和EDTA对黄鳍蛋白酶活力的影响

Tab.2 Effects of metal ion and EDTA on activities of protease from ricefield eel

金属离子和EDTA浓度/(mmol · L ⁻¹) Concentration of metal ion and EDTA	黄鳍蛋白酶剩余活性 Remaining activity of protease from ricefield eel				
	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	EDTA
2	96.5	93	86	104	65
6	96	82	82	104	60
10	89	82	82	104	48

3 讨论

由于黄鳍是典型的肉食性鱼类^[8],其消化道内的蛋白酶活性很高。实验结果显示,黄鳍蛋白酶是一种耐碱蛋白酶,在碱性范围内,pH值变化对酶活性影响甚微,在pH 12条件下放置5 h,相对酶活性还保持在55%。而一般生物碱性蛋白酶在pH 7~9最稳定,pH 10以上酶活性明显下降^[9-13]。黄鳍蛋白酶的最适温度为55℃,与大多数水生生物类似^[13-15],而酶相对稳定温度在30℃左右,由此可见,黄鳍蛋白酶在一定温度及强碱性条件下能有效发挥其作用,并保持相对稳定。

蛋白酶按活性中心分类一般分为丝氨酸、巯基和金属离子蛋白酶^[16]。从抑制剂及金属离子的实验结果来看,黄鳍蛋白酶应属于丝氨酸蛋白酶类,而不是巯基蛋白酶类,因为PMSF能明显抑制酶活性,浓度仅为5 μmol/L时,黄鳍蛋白酶活性已全部被抑制,但PCMB作用该酶时,活性却无明显变化。根据金属离子与蛋白质结合作用的大小,将需要金属的酶分为两大类:①金属酶,具有紧密结合的金属离子,通常为过渡态离子Cu²⁺、Fe²⁺等;②金属结合酶,金属离子结合较松,通常为碱金属或碱土金属离子如Na⁺、K⁺和Mg²⁺等^[17]。根据实验结果推测,黄鳍蛋白酶是一种金属蛋白酶,因为在反应过程中,Na⁺、K⁺和Mg²⁺对酶活性无激活作用,但EDTA能明显抑制酶活性,证明酶活性中心有金属离子存在。因此黄鳍蛋白酶活性中心存在丝氨酸残基,也可能同时有金属离子的存在。

黄鳍作为一种重要的水产品,其资源相当丰富,将黄鳍肠道作为废弃物丢弃,不仅浪费资源,更污染环境,因此对黄鳍肠道蛋白酶的研究,将有利于黄鳍的综合开发利用及环境保护。

参考文献:

- [1] 张家政. 黄鳍与泥鳅养殖技术[M]. 天津: 天津科技出版社, 1993.
- [2] 罗贵民. 酶工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 91-95, 332-378.
- [3] 施特尔马赫 H[德]. 酶的测定手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 233-254.
- [4] Lowry D H. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 267.
- [5] Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins[A]. Methods in Enzymology[M]. New York: Academic Press, 1957. III: 447.
- [6] 杨安钢. 生物化学与分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001. 248-252.
- [7] 周先明. 生物化学仪器分析与实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 183-192.
- [8] 伍 丽, 陈鹏非, 丰坤时, 等. 黄鳍肠道和肝胰脏主要消化酶活性的研究[J]. 湖北农学院学报, 2002, 22(1): 37-39.
- [9] 孙 盛, 穆朝阳, 王跃军, 等. 黄鳍黄肝菌 YS-9412-130 碱性蛋白酶性质鉴定[J]. 海洋水产研究, 2001, 22(2): 1-10.
- [10] 乙 引, 陈 平, 王 茜, 等. 木瓜蛋白酶应用开发的性质研究[J]. 贵州师范大学学报, 1998, 16(4): 15-20.
- [11] Caldas C, Cherqui A, Pereira, et al. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression[J]. American Society for Microbiology, 2002, 68(3): 1297-1304.
- [12] Natalia Y. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish[J]. Aquaculture, 2004, 233(1-4): 305-321.
- [13] 叶 玫, 吴成业, 王 勤, 等. 鳊鱼消化道蛋白酶的初步分离提取及性质的研究[J]. 海洋学报, 2000, 22(3): 131-136.
- [14] 李 志, 李大成, 董圣英, 等. 野鲮马黄肝蛋白酶性质研究[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2002, 25(3): 301-304.
- [15] 于国英, 朱 莉, 韩志武. 鲈鱼消化道中蛋白酶的分离纯化及其活性研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2002, (4): 54-56.
- [16] 黄文海. 酶应用手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989. 105.
- [17] 袁勤生. 现代酶学[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2001. 79-87.

Isolation, purification and some properties of *Monopterus albus* Zuiew protease

JIANG Xin-hong, TANG Yun-ming

(School of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China)

Abstract: After organic meshing, extracting solution by butanol, ammonium sulfate fractions, DEAE-Sephacryl chromatography and Sephacryl S-200 gel chromatography, the pure sample of protease from ricefield eel (*Monopterus albus* Zuiew) was obtained. The results showed that the specific activity was $1\,580\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$; the recovery rate was 10.6% and the purified fold was 272. The isoelectric point of enzyme was pH 6.2 by isoelectric focusing (IEF); the optimum temperature was $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, the optimum pH 10.5, $K_m\ 5.5\times 10^3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ by using the casein as substrate, and the molecular weight was 26 kD and 25.5 kD by SDS-PAGE and Sephacryl S-200 gel chromatography. The enzyme was stable in high pH ranges, especially at pH 9–11. The enzyme had high activity, and 55% activity remained after incubated in room temperature at pH 12 for 5 h, so this enzyme has alkali stability. The results also showed that NBS, BrAc, TNBS and PMSF strongly inhibited the enzyme activity that no activity was detected when the concentrations of the inhibitors NBS, BrAc, TNBS and PMSF were 10 mol/L, 100 mol/L, 500 mol/L and 5 mol/L, respectively, while PCMB and ME did not have obvious effects on enzyme activities. When the concentrations of PCMB and ME were up to 100 mol/L and 1 000 mol/L, respectively, 80% enzyme activity was detected. These results demonstrated that the protease from ricefield eel may be trypsin-like, and the residues of serine, tryptophan, histidine and lysine were essential for the enzyme's function, while the sulfhydryl-groups were not essential for the activity of the enzyme. When metal ions and EDTA were added in, Ca^{2+} didn't activate the enzyme; Mg^{2+} and K^{+} slightly inhibited the enzyme activity, but Na^{+} had no effects on enzyme activity. EDTA strongly inhibited enzyme activity; perhaps EDTA could inhibit enzyme activity by chelating metal ions, which were essential for the enzyme's function. All of the results indicated that the protease from the ricefield eel was a type of alkaline protease, which implied a prospect of the protease in application of medicament, chemical industry and others.

Key words: *Monopterus albus* Zuizw; protease; purification

Corresponding author: TANG Yun-ming. Tel: 023-68399122. E-mail: tbright@swnu.edu.cn