

文章编号: 1673 - 9620 (2007) 04 - 0037 - 04

FPLC 在纯化马铃薯酪氨酸酶中的应用*

吕新宇¹, 刘英杰², 刘英莉², 李 莉³, 江 敏³

(1. 江苏工业学院 精细化工研究所, 江苏 常州 213164; 2. 常州格雷特新材料科技有限公司, 江苏 溧阳 213372; 3. 武进第二人民医院, 江苏 武进 213011)

摘要: 对马铃薯酪氨酸酶的分离纯化进行了初探。其粗酶最佳硫酸铵盐析浓度 65 %, 最佳温度 30 °C, 最佳 pH 7.5。分别预装 Sephadex G75 分子筛凝胶柱和 HiTrap Q FF 阴离子交换层析柱在 FPLC 自动分离得到纯化的酪氨酸酶, 最高纯化倍数达 60, 并以 L - DOPA 作底物, 测得比酶活为 242.84 U/mg 蛋白。对酶活最大的组分进行了 SDS - PAGE 表征, 电泳呈现一条带, 相对分子质量为 5.6×10^4 。米氏常数 K_m 为 2.0 mmol/L。

关键词: 马铃薯酪氨酸酶; 快速蛋白液相色谱; 电泳

中图分类号: O 629.8

文献标识码: A

Research on Separation and Purification of Potato Tyrosinase by FPLC Method

LU Xin - yu¹, LIU Ying - jie², LIU Ying - li², LI Li³, JIANG Min³

(1. Institute of Fine Chemicals, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213164, China; 2. Changzhou Great New Material Technology CO., LTD, Liyang 213372; 3. The Second People's Hospital of Wujin, Wujin 213011)

Abstract: Tyrosinase was separated and purified from potatoes through salting precipitation, dialysis, DEAE - Sepharose FF column chromatography and HiTrap Q FF column chromatography. The optimal salting precipitation concentration of tyrosinase was about 65 %. The optimal temperature of was about 30 °C. The optimal pH was about 7.5. The specific activity was 242.84 U/mg. The molecular weight was 5.6×10^4 with SDS - PAGE. The K_m value of tyrosinase for L - DOPA was 2.0 mmol/L.

Key words: potato Tyrosinase; FPLC; electrophoresis

酪氨酸酶是一种含铜金属酶, 普遍存在于哺乳动物、植物和微生物中, 主要参与生物体内黑色素和其他多酚类物质的形成。该酶能催化单酚类物质生成 O - 二酚 (单酚酶活性), 并进一步转化成 O - 醌 (二酚酶活性), 生成的这些醌类物质易于多聚化, 并与细胞内蛋白作用, 生成黑色或棕色的色素沉淀。这种反应导致了水果和蔬菜变味以及营

养物质的丧失。因此, 酪氨酸酶在医药、环境、食品、精细化工等领域具有广泛的用途^[1]。

“FPLC”全称为快速蛋白液相色谱 (Fast protein liquid chromatography), 其原理是利用不同的层析柱 (疏水、离子交换、凝胶、亲和、反相等), 将所需的蛋白质 (酶、DNA 等) 或要去除的杂蛋白从样品中分离出来。

* 收稿日期: 2007 - 09 - 06

作者简介: 吕新宇 (1977 -), 男, 江苏泰兴人, 助理工程师, 学士。

马铃薯中富含酪氨酸酶, 本文研究使用 FPLC 从廉价易得马铃薯中纯化酪氨酸酶的方法, 并找到分离纯化的最佳条件。

1 实验材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜马铃薯购于乐购超市; L-DOPA (L-3-(3,4-二羟苯基)丙氨酸, 上海斯高勒生物科技); 牛血清白蛋白 (上海生化); 考马斯亮蓝 G-250 (Fluka 产品); Tris (羟甲基氨基甲烷, 上海国药); 其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

FPLC 蛋白质快速分离仪 (美国 Amersham 公司); 低温离心机 (德国 HETTICH 公司); UV-2102PCS 紫外可见光分光光度计 (上海 UNICO 公司); 电泳仪、电泳槽以及凝胶成像仪 (美国 BIO-RAD)。

1.3 测定方法

酪氨酸酶的酶活力测定参照文献 [2], 酪氨酸酶酶活定义为: 在 1.013×10^5 Pa 下, 以 L-DOPA 为底物, 在 pH 7.5 和 30 条件下水浴反应 10 min, 测定 475 nm 波长下的吸光值, 以每分钟催化生成 $1 \mu\text{mol}$ 产物多巴色素的酶量为一个活力单位。

蛋白含量按 Lowry 法测定^[3], 以牛血清白蛋白为标准。

SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯度和测定相对分子质量^[4,5]。

米氏常数的测定。以 L-DOPA 为底物, 分别测定酶在底物浓度 2.0 ~ 5.0 mmol/L 的反应速度, 按 Lineweaver-Burk 作图, 求 K_m 值。

1.4 FPLC 纯化酪氨酸酶方法

粗酶的提取。马铃薯切碎, 按照 1:2 比例加入 pH 7.5 预冷的 0.02 mol/L 乙酸钠缓冲液, 高速匀浆, 用 4 层纱布对浆液进行过滤, 滤液于 0 ~ 5 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。上清液加固体硫酸铵分级沉淀, 取 50% ~ 70% 饱和度的沉淀用 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液进行透析 12 h 的粗酶液。

FPLC 纯化酪氨酸酶参照文献 [6, 7]。用 Se-

phodex G75 分子筛凝胶柱, 进样量为 2 mL, 0.01 mol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液和 0 ~ 0.4 mol/L NaCl 梯度洗脱。Hi Trip Q FF 离子交换柱进行层析分离, 进样量为 0.5 mL, 所用洗脱液 A 为 0.02 mol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 洗脱液 B 为 0.02 mol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液加 1 mol/L NaCl 溶液。

2 结果与讨论

2.1 酪氨酸酶粗酶提纯的条件分析

酪氨酸酶提纯的条件主要包括最佳硫酸铵盐析浓度, 最佳温度, 最适 pH, 见图 1 至图 3。

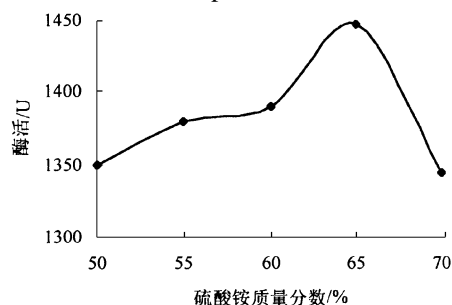


图 1 不同浓度硫酸铵盐析的酶活曲线图

Fig 1 Salting precipitation of potato Tyrosinase

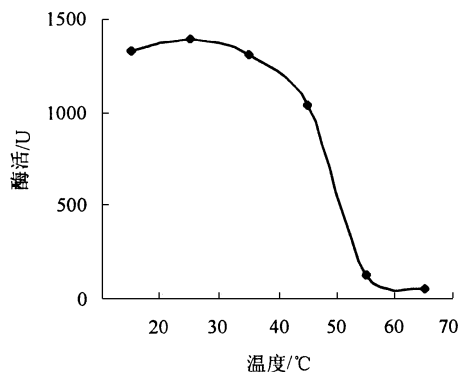


图 2 热稳定性曲线

Fig 2 Thermal stability of potato Tyrosinase

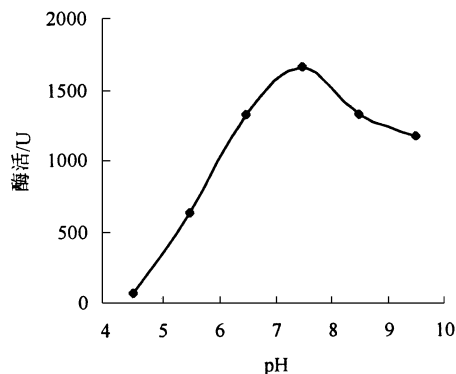


图 3 酸碱稳定性曲线

Fig 3 pH stability of potato Tyrosinase

由图 1, 65 % 硫酸铵饱和度下酶活最高, 因此 65 % 的盐析浓度为最佳。

由图 2, 酪氨酸酶在 40 °C 以下比较稳定; 从 20 °C 升到 40 °C, 酶活变化不大; 在 30 °C 左右酶活达到最高; 但从 50 °C 升到 70 °C 时, 酶活迅速变小, 60 °C 以后, 几乎没有酶活。

由图 3, 从 pH 为 4.5 ~ 7.5 时, 酶活逐渐增大; 酶活在 pH 为 7.5 达到最高; 在 pH 为 7.5 ~ 9.5 逐渐下降, 因此酪氨酸酶的最适 pH 为 7.5。

2.2 FPLC 纯化酪氨酸酶

2.2.1 以 Sephadex G75 分子筛凝胶柱分离粗酶

如图 4, 在进样后 12 ~ 14 min 时会出现一个高的窄 A 峰, 其峰顶的吸光度为 1 050 mAU 左右, 收集此峰为 1 号管。在进样后 16 ~ 18 min 会出现一个较小的单峰 B, 其峰顶的吸光度在 600 mAU 左右, 收集此峰为 2 号管。当洗脱液的体积达到 2 个柱体积时, 吸光度基本没有明显变化。分离完毕后, 分别测得 1、2 号试管的酶活为 234.3 U 和 211.1 U, 这两个蛋白峰酶活相差不大, 故无法判别哪个峰是我们所需要的酪氨酸酶, 所以将这两个组分再进行阴离子交换层析, 希望通过结合力的不同将它们分离。

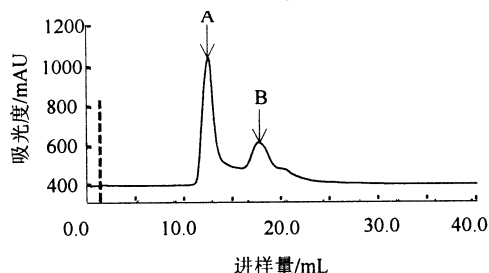


图 4 Sephadex G75 分子筛凝胶柱分离的 UV 吸收

Fig 4 Purification of Tyrosinase on Sephadex G75 column chromatography method

2.2.2 以 HiTrap Q FF 阴离子交换柱分离粗酶

如图 5, 进样后, 在 50 min 之内洗脱毕。在进样后 1 ~ 3 min 时会出现一个流川峰, 其峰顶的吸光度为 670 mAU 左右, 此峰是由于酶液中过剩的阳离子被洗脱出来产生的。在进样后 8 ~ 10 min 会出现一组结构紧密的多重峰, 其峰顶的吸光度在 880 mAU 左右, 此时的 pH 有明显下降, 收集 A、B、C 各峰。当洗脱液的体积达到 2 个柱体积时, 吸光度基本没有明显变化。分离完毕后, 分别测出 A、B、C 峰的酶活分别是 100.9 U、242.8 U、0.0 U。由于 A、C 峰酶活较小甚至没有酶活, 所

以将酶活最大的 B 峰进行电泳表征。

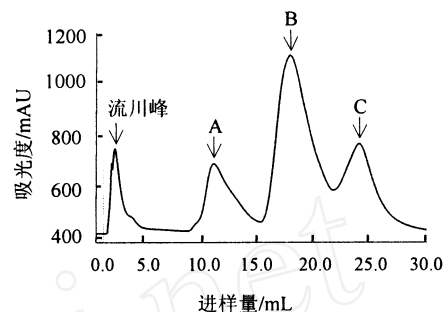


图 5 HiTrap Q FF 离子交换柱分离 UV 吸收

Fig 5 Purification of Tyrosinase on HiTrap Q FF column chromatography method

2.3 电泳分析

HiTrap Q FF 离子交换柱纯化后收集到的第二个峰进行 SDS - PAGE 表征, 由图 6, 只有一条条带, 证明了该酶达到了电泳纯。用标准曲线计算出相对分子质量是 5.6×10^4 , 较文献 [2] 4.0×10^4 有较大不同, 原因可能是由于土豆品种的不同或者是其同工酶的影响^[2] 导致酶在相对分子质量的差异。

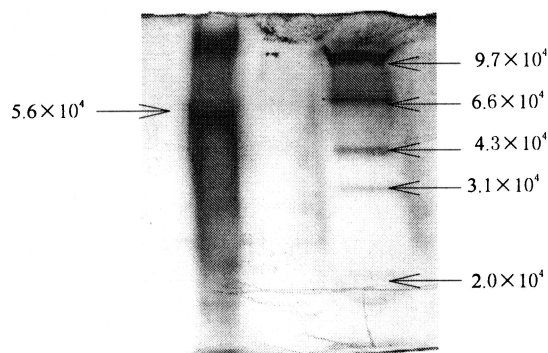


图 6 马铃薯酪氨酸酶的 SDS - PAGE

Fig 6 SDS - PAGE of potato tyrosinase

2.4 纯化倍数的比较

表 1 列出了各个纯化步骤的比酶活和纯化倍数, 经过 FPLC 纯化之后, 纯化倍数达到了 63.6, 达到了电泳纯, 高于文献 [2] 50 倍的纯化倍数。

该方法不但成本低, 同时在性能上具有高稳定性和高重复性的特点, 能够较好实现酪氨酸酶的分离, 只是在流速上比商品化的预装柱慢一些, 一般预装柱的流速为 1 ~ 2 mL/min, 实验室常规手段填装的层析柱流速一般为 0.5 ~ 1 mL/min 左右。

表 1 各纯化步骤的比酶活值及纯化倍数

处理步骤	比酶活/ (U/mg)	纯化倍数
土豆匀浆液体	3.8	1.0
硫酸铵盐析	22.0	5.8
透析粗酶	110.8	29.0
Sephodex G75	234.3	61.3
Hi Trip Q FF	242.8	63.6

2.5 底物专一性及米氏常数

马铃薯酪氨酸酶兼具有单酚酶活性和二酚酶活性, 与粗酶相比, 纯化酶的单酚酶活性丧失很快, 而二酚酶活性较为稳定, 因此以 L-DOPA 为底物, 改变底物浓度, 在最适条件下测定酶在不同底物浓度时的酶活力, 并按 Lineweaver-Burk 作图, 求出 K_m 为 2.0 mmol/L, 见图 7。

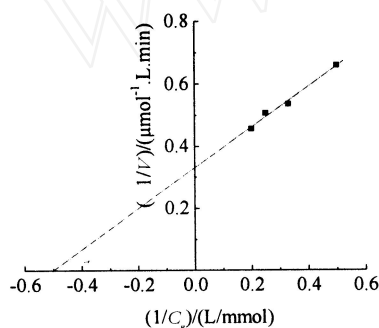


图 7 Lineweaver-Burk 曲线

Fig 7 Lineweaver-Burk plot

3 结 论

马铃薯酪氨酸酶提取的最佳条件是硫酸铵盐浓度 65%、温度 30℃、pH 7.5。通过盐析、透析、FPLC 等步骤分离纯化的马铃薯酪氨酸酶, 其最后的纯化倍数达 63.6, 达到了电泳纯, 证明了 FPLC 应用与从马铃薯中提取较纯酪氨酸酶的优越性。经电泳表征, 酶的相对分子质量为 5.6×10^4 。以 L-DOPA 为底物, K_m 为 2.0 mmol/L。

参考文献:

- [1] 章廷红, 葛长海, 万海清. 酪氨酸酶的应用研究进展 [J]. 沿海企业与科技, 2005, 2: 161-163.
- [2] 胡源, 刘克武, 喻东, 等. 马铃薯酪氨酸酶的性质 [J]. 化学研究与应用, 2005, 17 (1): 55-57.
- [3] 袁玉荪, 朱婉华, 陈钧辉. 生物化学实验 [M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1988.
- [4] 郭尧君. 蛋白质电泳技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [5] 陈丹华. 蛋白质、凝胶电泳及其分析应用 [J]. 分析科学学报, 1995, 11 (3): 75-86.
- [6] Antonio Rescigno, Francesca Sollai, Enrico Sanjust, et al. Diafiltration in the presence of ascorbate in the purification of mushroom Tyrosinase [J]. Phytochemistry, 1997, 46 (1): 21-22.
- [7] Kwang-Hoon Kong, Min-Pyo Hong, Aang-Sook Choi, et al. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from Thermomicrobium roseum [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2000, : 113-118.