

猪心肌乳酸脱氢酶的提纯工艺及酶反应最适条件

王立艳,汪建军,杨海麟,王武

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室,214036,江苏,无锡)

[摘要] 研究了适合于工业化生产的猪心肌乳酸脱氢酶的初步提取工艺,经硫酸铵分级沉淀得到酶的比活为 86.5 U/mg,再经 DEAE 离子交换层析比活可达 525.0 U/mg,酶活总收率为 54.5%。并对酶促反应的最适条件进行了研究,其最适反应 pH 为 7.6~7.8,最适反应底物浓度分别为 NADH 5 mg/mL 和丙酮酸钠 25 mmol/L。

[关键词] 乳酸脱氢酶,离子交换层析,硫酸铵分级沉淀,纯化

[中图分类号] Q554⁺.9, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2004)02-0070-04

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH, EC 1.1.1.27)又称为 NAD 氧化酶,是生物体内糖酵解过程中一个重要的氧化还原酶^[1],动物组织中的 LDH 是由两种亚单位组成的四聚体,有 5 种同工酶,即 LDH-1(H₄)、LDH-2(H₃M)、LDH-3(H₂M₂)、LDH-4(HM₃)、LDH-5(M₄)^[1,2],它的相对分子质量为 130 000~150 000。LDH 是重要的医用诊断用酶,用作生产丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒的主要原料,广泛用于生化研究、丙酮酸盐的检定,白血病及心肌梗死的诊断,还可作为食品添加剂用于发酵奶制品、腌渍品和饮料的生产中。该酶普遍存在于动物、细菌及植物中^[3]。目前 LDH 一般从动物脏器尤其是心肌和骨骼肌中提取。国内试剂生产厂家所用 LDH 需要进口,手续烦琐,供货不及时,很大程度上影响了相关诊断试剂的生产。近几年多用染料亲和层析法^[4,5]纯化 LDH,该方法有成本高和操作较繁的缺点。本研究是从适合于工业化生产的角度出发,寻求一系列分离条件,从猪心肌提纯出乳酸脱氢酶。我们参考了邹岳奇等^[6]报道的方法,在此基础上做了大量改进,并结合 DEAE 离子交换层析法从猪心肌提纯得到比活和得率都较高的 LDH。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

猪心,市场上购买并冷冻;NADH,上海生工 Amresco 进口分装产品;DEAE-Sepharose 离子交换剂,Pharmacia 公司产品;高速冷冻离心机,UV-754 紫外分光光度计,高速组织匀浆机,整套柱层析分析系统。

匀浆缓冲液:0.05 mol/L pH7.6Tris-HCl 缓冲液。

1.2 实验方法

1.2.1 酶活测定方法^[7]

乳酸脱氢酶的催化反应式:



用连续监测法测定 340 nm 处吸光度的变化可计算出 LDH 的活力。

酶活力单位定义为:25℃,最适 pH 条件下,每分氧化 1 μmol 的 NADH 或还原 1 μmol 的 NAD 所需要的酶量为 1 个酶活单位(U)。

1.2.2 蛋白含量测定方法

Bradford 检测法^[8]。

1.2.3 猪心肌粗酶液的制备

猪心肌切成细条去脂肪及结缔组织并经 -20℃ 冷冻后,加入 2~4 倍预冷于 4℃ 的匀浆缓冲液,高速组织匀浆机制成匀浆,4℃ 下置磁力搅拌器上缓慢搅拌 1~2 h,4 000 r/min 离心弃沉淀上清液即为猪心粗抽提液。

1.2.4 酶纯化的技术路线

猪心肌酶粗提液的制备→硫酸铵分级沉淀→DEAE 离子交换层析分离纯化

收稿日期:2003-12-26。

作者简介:王立艳,女,1976-,江南大学生物化学与分子生物系硕士研究生,主要从事生化用酶研究与应用,E-mail:wangly76@sina.com

通讯联系人:王武,女,1952-,江南大学生物化学与分子生物系教授,博士生导师,主要从事分子遗传学的教学与研究。

— 70 —

2 结果与讨论

2.1 酶提纯工艺的研究

2.1.1 匀浆缓冲液的选择与用量的确定

一旦细胞破碎,其原有胞内体系即被破坏,各种酶分子在胞内互相制约的体系不复存在.胞内原有的各种蛋白酶随时有可能水解其他酶类,因此从细胞破碎开始,须用合适的缓冲液来悬浮组织.比较两种常用的缓冲液的抽提效果,pH 7.6 的 Tris-HCl 和磷酸钾缓冲液,均采用 2 倍体积量进行抽提,经多次试验结果发现用 Tris-HCl 缓冲液抽提时粗酶液浓度为 90 U/mL 左右,用磷酸钾缓冲液时酶浓度在 70 U/mL 左右.不同 pH 和浓度的 Tris-HCl 缓冲液抽提效果的比较如表 1.

从表 1 中可知用 0.05 mol/L pH 7.6 的 Tris-HCl 缓冲液效果最好.表 2 为用不同倍体积的匀浆缓冲液进行酶的抽提效果比较,按单位重量的猪心计算收获的酶量相差不大,而粗酶液的酶浓度却相差很大,考虑到后提取过程中需要对酶液进行浓缩处理,则第一步制备粗酶液匀浆缓冲液的用量定为 2 倍体积的量.

表 1 匀浆缓冲液的选择

缓冲液组成	平均酶浓度/(U/mL)
0.05 mol/L pH 7.2 Tris-HCl	82.2
0.05 mol/L pH 7.6 Tris-HCl	90.0
0.1 mol/L pH 7.6 Tris-HCl	83.1
0.05 mol/L pH 7.9 Tris-HCl	78.5

条件:各种缓冲液用量为 2 倍猪心的量.

表 2 匀浆缓冲液用量的比较

体积倍数	酶浓度/(U/mL)	猪心中的收获酶量/(U/g)
2	90.0	180.0
3	64.0	192.0
4	52.6	210.4
5	42.9	214.5

条件:匀浆缓冲液用 50 mol/L pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液.

2.1.2 硫酸铵分级盐析

粗酶液中分批加入硫酸铵使之达到不同的饱和度,分别沉淀杂蛋白和目的酶,二次沉淀后收集含目的酶的沉淀物溶于缓冲液中.一级沉淀曲线如图 1,从图中分析,硫酸铵一次沉淀用 40% 饱和度沉淀去除杂蛋白的效果最好,上清液中酶的比活力最高.二级沉淀效果曲线如图 2,由图可知硫酸铵饱和度达 60% 时所得酶活最高,但沉淀出的蛋白量显著增高,说明杂蛋白明显增加.而饱和度为 55% 时沉淀出的杂蛋白较少,从比活曲线得出:用饱和度为 55% 的硫酸铵作二次沉淀比活力最高.

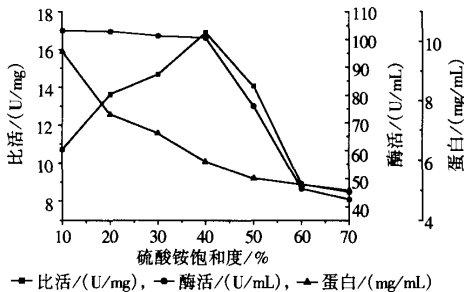


图 1 硫酸铵一级沉淀曲线

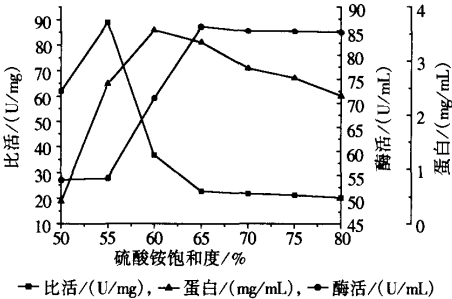


图 2 硫酸铵二级沉淀曲线

硫酸铵分级沉淀还可起到浓缩的作用,在下一步纯化时,二级沉淀后收获的目的酶沉淀物用尽量少量的缓冲液溶解使之浓缩并透析除盐.

2.1.3 DEAE 离子交换层析

经硫酸铵二次盐析后收获的目的酶浓缩后于 4℃ 在 0.05 mol/L, pH 7.2 磷酸钾缓冲液中充分透析过夜上 DEAE 离子交换柱,洗脱方式为盐梯度洗脱,洗脱液的 A₂₈₀ 紫外检测峰曲线如图 3. 经检测乳酸脱氢酶在第二个峰处被洗脱下来,各管号酶样的酶活、比活曲线如图 3,比活最高者为 618.8 U/mg. 收集比活相对较高分部混合,上柱收率达 72.8%,比活为 525.09 U/mg.

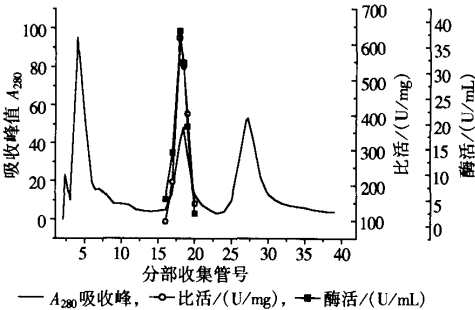


图 3 DEAE-Sepharose 离子交换

2.1.4 纯化工艺总结

按猪心 10 g 计,经匀浆缓冲液抽提、硫酸铵分级沉淀和 DEAE 离子交换层析一系列纯化工艺(如表 3),得到比活为 525.09 U/mg 的酶样,纯度较高,已能满足工业用酶的要求^[9].美国 Sigma 公司根据酶的用途不同有不同规格和纯度的猪心肌乳酸脱氢酶,本研究提纯得的猪心肌乳酸脱氢酶可用于工业中生化研究和食品添加剂,若用作医用测定酶可用分子筛或疏水层析进一步纯化.

表 3 纯化工艺总结

纯化步骤	体积/mL	酶活 U/mL	蛋白 mg/mL	比活 U/mg	纯化倍数	总回收率/%
粗酶液	21	103.30	9.660	10.69		100
一级沉淀	20.6	100.56	5.954	16.89		95.5
二级沉淀	8.2	198.0	2.288	86.54	8.1	74.8
DEAE 离子交换	41	28.88	0.055	525.09	49.1	54.5

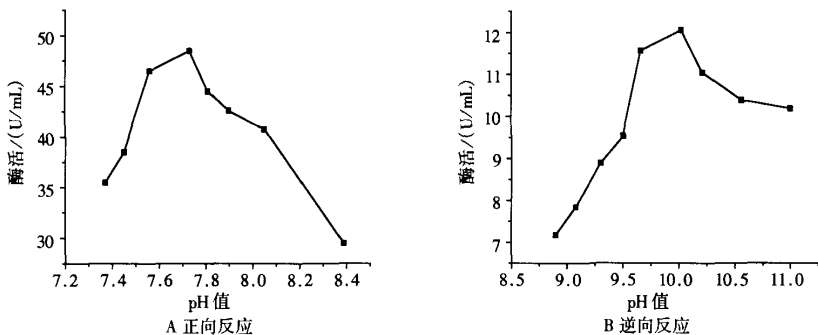
2.2 酶促反应最适条件的研究

酶活的测定需要在最适反应条件下进行,为此以提纯的酶研究了酶催化反应的最适条件,根据酶活定义,反应温度定为 25℃.乳酸脱氢酶是一多底物酶,催化两向反应,故分别研究了两向反应酶作用的最适 pH 值及适合于猪心肌酶催化反应方向的最适底物浓度.

2.2.1 两向反应酶活测定方法的比较及酶反应最适 pH 值

乳酸脱氢酶正向催化反应(即丙酮酸盐→乳酸盐)需丙酮酸盐和 NADH 两种底物,逆向反应(即乳酸盐→丙酮酸盐)需乳酸盐和 NAD 两种底物.分别用两个方向的反应在底物过量的条件下测定 pH 值对酶活的影响.如图 4.

图 A 和图 B 分别是以丙酮酸钠和乳酸钠为底物不同 pH 值测酶活.从两图中明显看出正向反应时酶反应的最适 pH 在 7.6~7.8,而逆向反应最适 pH 在 10 左右.同时,以正向反应测得的酶活明显比逆向反应所测得的酶活大得很多,分析其原因是:H 型乳酸脱氢酶适合于好氧环境中起催化反应,而 M 型的适合于在厌氧环境中起催化作用^[2].心肌中的乳酸脱氢酶主要以 H 型亚基存在,故用正向反应适合于所提取酶的酶活测定.



注:A 正向反应体系为:0.05 mol/L 不同 pH 的磷酸钾缓冲液;B 逆向反应体系为:0.1 mol/L 不同 pH 的甘氨酸-NaOH 缓冲液

图 4 pH 值对酶促两向反应的影响

2.2.2 正向反应酶最适底物浓度的测定

正向反应酶反应的底物包括丙酮酸钠和 NADH,在最适反应 pH 7.6~7.8 的条件下分别研究两种底物的浓度对酶活的影响.如图 5 和图 6.

由图 5 可知,底物丙酮酸钠不足时酶一加入即完全被消耗而使所测酶活很低,但高度的丙酮酸盐又对酶活有抑制作用.底物 NADH 对酶活也有类似的影响(图 6),这是由于从还原辅酶 I(NADH)形成的非竞争性抑制剂对还原反应有一定的抑制作用.

通过对该酶酶促反应基本条件的研究,确定了酶作用的最适 pH 7.6~7.8,最适底物浓度分别为 25 mmol/L 丙酮酸钠和 5 mg/mL NADH.

本项目以肉制品加工过程的副产物猪心作原料,原料来源丰富,价格便宜;在工艺纯化的设计中,我们以工业化生产 LDH 为目的,对工艺条件进行优化,取得了满意的结果.该工艺具有操作简便、成本低廉等

特点,易于工业化放大。

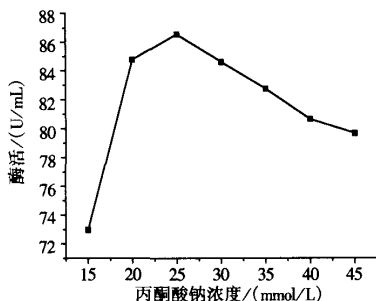


图5 丙酮酸钠对酶活的影响

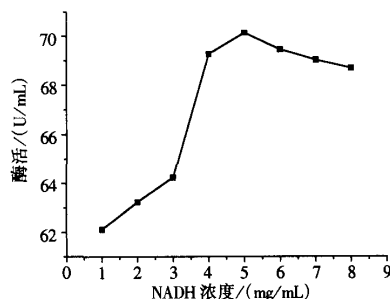


图6 NADH对酶活的影响

[参考文献]

- [1] Al-Jassabi S. Purification and Kinetic Properties of Skeletal Muscle Lactate Dehydrogenase from the Lizard *Agama stellio stellio*[J]. Biochemistry (Moscow), 2002, 67(7): 786—789.
- [2] Cahn R D, Kaplan N O, Levine L, *et al.* Nature and Development of Lactic Dehydrogenases[J]. Science, 1962, 136: 962—969.
- [3] Oluoha U. Purification and Kinetic Characterisation of Lactate Dehydrogenase from *Dioscorea cayenensis* tuber[J]. Biologia Plantarum, 2001, 44(4): 535—539.
- [4] Per-Erik, G, Per-Olof L. Continuous Superporous Agarose Beds in Radial Flow Columns[J]. J Chromatogr A, 2001, 925: 69—78.
- [5] Fernandes S, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. Selective Recovery of Lactate Dehydrogenase Using Affinity Foam[J]. Biotechnol Bioeng Aug, 2002, 79(4): 472—80.
- [6] 邹岳奇, 刘玉翠, 阎静辉, 等. 硫酸铵沉淀及反向抽提法纯化乳酸脱氢酶[J]. 河北省科学院学报, 1992, (3): 60—63.
- [7] 蒋传葵. 工具酶的活力测定[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [9] 周学良, 主编. 生物化学品(精细化工产品手册)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.

Purification and Optimal Reaction Conditions of Lactate Dehydrogenase(LDH) from Porcine Heart

Wang Liyan, Wang Jianjun, Yang Hailin, Wang Wu

(Key Laboratory of Industry Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, 214036, Wuxi, China)

Abstract: Industrialized purification of Lactate Dehydrogenase(LDH) from porcine heart was studied. The specific activities of the enzyme purified by ammonium sulfate fractionation precipitation and DEAE ion exchange chromatogram were 86.5 U/mg and 525.0 U/mg respectively with 54.5% total recovery. Moreover, its optimal reaction conditions were studied, and the optimal pH was 7.6~7.8, the optimal substrate concentration of NADH and pyruvate was 5 mg/mL and 25 mmol/L respectively.

Key words: Lactate Dehydrogenase(LDH), ion exchange chromatography, ammonium sulfate fractionation precipitation, purification

[责任编辑: 孙德泉]