

平板扩散法粗略确定碱性脂肪酶的活性^①

邬敏辰¹ , 孙崇荣¹ , 邬显章²

(1. 复旦大学生物化学系 ,上海 200433 ; 2. 无锡轻工大学中央研究所 ,江苏无锡 214036)

摘要 通过对圆弧青霉 PG37 所产碱性脂肪酶活性测定方法的研究和比较 ,建立了一种快速、直观、灵敏的固体琼脂平板脂肪酶活性测定方法。利用脂肪酶在一定条件下分解三丁酸甘油酯所释放出的游离脂肪酸使指示剂(维多利亚蓝)变色的原理 ,根据变色圈直径的大小对酶活性进行粗略分析 ,特别适合于酶提纯过程中大批量样品酶活性的估测以及酶活性条带和其它蛋白质条带的区分。

关键词 :碱性脂肪酶 ;平板测定法 ;变色圈 ;聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号 :Q556

文献标识码 :A

Diffusion Plate Assay for Quick and Rough Estimation of Alkaline Lipase Activity

WU Min-chen¹ , SUN Cong-rong¹ , WU Xian-zhang²

(1. Department of Biochemistry , Fudan University , Shanghai 200433 ; 2. Central Research Institute , Wuxi University of Light Industry , Wuxi 214036)

Abstract : Based on studies and comparison among the assay of the activity of alkaline lipase produced by *Penicillium cyclopium* PG37 , a rapid , direct and sensitive solid agar plate method for the assay of the activity of alkaline lipase was developed. The underlying principle employed in this method was based on colour change of the indicator(Victoria Blue) caused by free fatty acids liberated from tributyrin under proper conditions. Lipase activity was analyzed quickly and roughly according to the diameters of the halos. The method specially fitted for the assay of the activity of lipases in large series of samples collected in enzyme purification and the differentiation of activity bands of proteins and other bands of proteins.

Key words : alkaline lipase ; plate method ; colour halo ; gel electrophoresis

脂肪酶的测定方法很多 :酸碱滴定法^[1] ,电位滴定法^[2] ,浊度测定法^[3] ,甘油测定法^[4]和色谱分析

法^[5]。这些测定方法步骤烦琐 ,不适合于大批量样品的快速测定。为了简化测定过程 ,许多研究者对

① 收稿日期 :1999 - 05 - 05 ;修订日期 :1999 - 11 - 24。

基金项目 :国家“九五”科技攻关项目资助课题(96 - C03 - 02 - 01)。

作者简介 :邬敏辰(1962 年 6 月生) ,男 ,江苏无锡人 ,植物学博士研究生 ,高级工程师。

万方数据

酶的粗略测定方法进行了改进 , 其中主要是固体琼脂平板法。即针对不同性质和来源的脂肪酶 , 以不同的底物和指示剂来测定酶活性。Karnetova 等^[6]以吐温为底物 , Nile blue 作为指示剂 , 采用固体琼脂平板法 , 根据孔周围形成变色圈的大小来测定脂肪酶活性。但该方法形成的变色圈较模糊 , 不易准确测量变色圈的直径。有人采用以三油酸甘油酯为底物和罗丹明 B 作为指示剂的固体琼脂平板法来测定脂肪酶活性 , 以荧光圈的大小来判断酶活性的大小^[7] , 但发现该方法在实际操作中重复性较差 , 很难得到确定的结果。

Mourney 等^[8]采用以三丁酸甘油酯为底物的固体琼脂平板法来筛选产脂肪酶的菌种 , 根据菌落周围形成透明圈的大小来挑选高产菌种 , 但该方法不易形成清晰的透明圈 , 特别是当酶活性较低时。研究发现 , 如果在固体琼脂平板内添加维多利亚蓝作为指示剂 , 可明显地提高测定方法的清晰度和灵敏度。该方法可用于产脂肪酶菌种的筛选、批量酶样品的活性测定以及聚丙烯酰胺凝胶电泳酶活性条带的确定等。

1 材料与方法

1.1 碱性脂肪酶

产酶菌株圆弧青霉(*Penicillium cyclopium*) 突变株 PG-37 , 由无锡轻工大学酶工程实验室提供。将 PG-37 菌株在一定条件下进行液体深层发酵 , 其发酵醪经过滤、硫酸铵沉淀和干燥等步骤 , 制成粗脂肪酶粉。

1.2 试剂

Sephadex G-75 Pharmacia 公司产品 ; 丙烯酸胺和 N,N-甲叉丙烯酰胺 Fluka 公司产品 ; TEMED Bio-Rad 公司产品 ; 聚乙烯醇 聚合度为 1 750 ± 50 橄榄油 , 三丁酸甘油酯 , 维多利亚蓝及其它常用化学试剂。

1.3 仪器

层析柱($D 1.6\text{ cm} \times 60\text{ cm}$) , 蠕动泵 , 核酸蛋白检测仪 , 记录仪 , 自动部分收集器 , 垂直板型电泳系统 , SX-300 快速成像仪 , 高速组织捣碎机 , 恒温水浴锅 , pHHS-3C 型精密酸度计等。

1.4 脂肪酶活性测定

1.4.1 酶活性单位定义 在一定反应条件下 , 每分钟水解产生 1 μmol 游离脂脂酸的酶量定义为一个脂肪酶单位。计算公式 :

$$U = \frac{V - V_0}{\text{万方数据}} \times 50 \times n$$

其中 : U ——酶活性($\mu\text{mol}/\text{min}$) , V ——样品耗碱量(mL) , V_0 ——空白耗碱量(mL) , 50—— 1 mL 0.05 mol/L NaOH 的微摩尔数 , t ——反应时间(min) , n ——稀释倍数

1.4.2 电位滴定测定法 测定方法和试剂配制见文献 [9] , 以橄榄油为底物。

1.5 Sephadex G-75 柱层析

Sephadex G-75 操作步骤见文献 [10]。柱层析条件为 : 平衡液和洗脱液为重蒸水 , $1.6\text{ cm} \times 60\text{ cm}$ 层析柱 , 酶液上柱量 1 mL , 洗脱速度 0.4 mL/min , 10 min 收集一管。整个过程用部分收集器和自动记录仪分别收集样品和记录洗脱曲线 , 最后测定每管的酶活性与蛋白质含量。

1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用不连续垂板状电泳系统 , 分离胶质量浓度 7 g/dL , 浓缩胶质量浓度 3 g/dL , Tris-HCl 缓冲体系 , 具体操作见文献 [11]。

1.7 固体琼脂平板测定法

1.7.1 固体琼脂平板的制备 分别将 2.5 g 琼脂粉、6.25 mL 三丁酸甘油酯、18.75 mL 3 g/dL 聚乙烯醇、2.5 mL 1 g/dL 维多利亚蓝和 225 mL NaOH-Gly(0.05 mol/L , pH 10.0) 缓冲液加入 500 mL 三角瓶中 , 加热溶解琼脂粉 , 趁热用高速组织捣碎机均质 , 倒平皿 , 静置冷却 , 制成含酶作用底物和指示剂的固体琼脂平板。

1.7.2 应用平板法测定酶活性 在已制成的固体琼脂平板上用打孔器开孔(直径 3.5 mm) , 打孔后用注射针头将孔内琼脂挑出 , 在酒精灯上烘烤背面 , 使琼脂与平皿底部贴紧 , 将 30 μL 待测酶液加入孔中 , 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中反应一定时间 , 定时观察孔周围的变色情况。

1.7.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳印迹法 根据各蛋白组分的相对分子质量大小、形状以及所带净电荷多少等因素所造成的电泳迁移率的差别 , 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳的分离和蛋白质混合样品的检测 , 不同纯化程度的酶液经凝胶电泳、固定、染色和脱色等步骤 , 可观察到分离后的蛋白质条带 , 但不能确定脂肪酶蛋白质条带的相对位置。为此 , 在平板测定法基础上 , 建立了非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳印迹法。将电泳后的凝胶首先用蒸馏水漂洗 1~2 次 , 然后将该凝胶轻轻放在固体琼脂平板上 , 在没有位移的情况下 , 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中反应 , 10 min 左右可观察到有变色条带出现 , 这时可将凝胶取下 , 再显示所有蛋白质条带 , 最后比较固体琼脂平板上脂肪酶活性条带和凝胶所显示的条带 , 即可确

定脂肪酶活性蛋白条带的相对位置和数目.

1.8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用不连续垂板状电泳系统,分离胶质量浓度 15 g/dL,浓缩胶质量浓度 3 g/dL,按 Laemmli^[2]垂直板状 SDS-PAGE 方法进行.

2 结果与讨论

2.1 固体琼脂平板酶活性测定标准曲线

称取 1.0 g 酶粉(约 12 000 μmol/(g·min)),加

表 1 不同活性标准酶溶液与变色圈直径的关系

Tab.1 The relationship between different activities of enzyme and diameters of rings changed colour						
A*/(μmol/(min·mL))	lg A	每孔加样量/μL	每孔酶活单位/(μmol/min)	变色圈直径/mm	有效直径/mm	
1000	3	30	30	13.9	10.4	
250	2.40	30	7.5	12.0	8.5	
62.5	1.80	30	1.88	10.2	6.7	
15.63	1.19	30	0.47	8.4	4.9	
3.91	0.59	30	0.12	6.7	3.2	

注:A 为标准酶活.

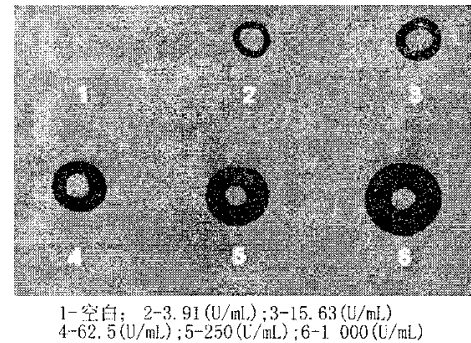


图 1 不同活性标准酶溶液在固体琼脂平板上所形成的变色圈的大小

Fig.1 The size of rings formed on agar plate with different activities of enzyme solution

将表 1 中有效直径对酶活性的对数作图,发现它们之间成线性关系.因此,在一定反应条件下,通过测量变色圈直径,根据标准曲线可以计算待测酶溶液的活性.该方法具有灵敏度高和操作步骤简单等特点,一次测定近百个样品只需 30 min,特别适合于柱层析后收集管中样品的酶活性测定和产酶菌种的筛选.

固体平板测定法用于酶样品的定量测定误差很大(相对误差为±20%),但用于样品的定性分析和定量的初步测定是一个极好的方法.因此,在用该方法初步确定样品酶活性后,再视情况用电位滴定法测定样品的精确活性.例如,Kalpit^[13]等就曾采用平板测定法对纯化过程中的 40~60 份样品一次测定,利用脂肪水解释放出的游离脂肪酸与钙离子

8 mL 蒸馏水溶解,离心取上清液,定容至 10 mL,用电位滴定法测酶溶液活性,调整至 1 000 μmol/(min·mL),作为原酶液.将原酶液按 4 的倍数稀释成不同酶活性单位的标准溶液,分别取 30 μL 标准溶液加入固体琼脂平板的孔中,置 30 ℃ 恒温培养箱中反应 24 h,测变色圈的直径.有效直径等于变色圈直径减去加样孔直径,观察有效直径与酶活性的对数之间的关系,实验结果如表 1 和图 1 所示.

反应 根据孔周围形成沉淀圈的大小来判断酶活性的大小,最后再用电位滴定法对有酶活性的馏分以确定其酶活.

2.2 反应时间对变色圈形成的影响

分别将 30 μL 不同活性的标准溶液加入固体琼脂平板的孔中,置于 30 ℃ 恒温培养箱中反应,在 12 24 48 72 84 h 观察反应情况并测变色圈的直径.实验表明,恒温培养 2 h 后就能看到孔周围出现变色圈,但直到 12 h 变色圈与本底之间也未能形成清晰的轮廓线;反应 24~72 h 轮廓线明显,便于准确测量变色圈的直径;84 h 后,在原来变色圈的外面又形成一圈颜色较淡的环,影响了测定结果的准确性.恒温反应 24 48 72 h 对变色圈直径变化的影响见图 2,与 Samad^[14]等报道的采用吐温 80 和维多利亚蓝平板的结果类似.

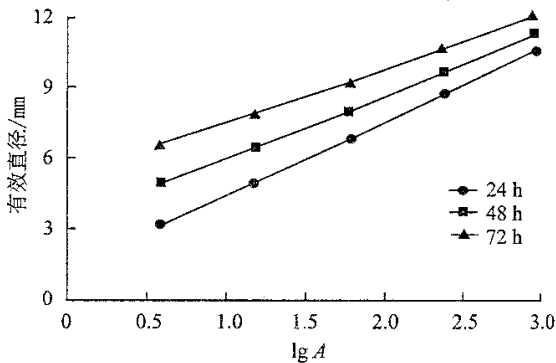


图 2 反应时间对变色圈直径的影响

Fig.2 The effect of reaction time on the diameters of rings

2.3 固体琼脂平板法应用举例

2.3.1 Sephadex G-75 柱层析收集管样品酶活性的测定 粗酶首先用 Phenyl-Sepharose CL-4B 和 DEAE-Sepharose fast flow 柱层析纯化,将初步纯化的酶溶液冷冻干燥后,溶于 1 mL 蒸馏水作为上样液,用 Sephadex G-75 柱层析进一步提纯,结果见图 3.洗脱后,呈现一个对称的蛋白吸收峰.样品酶活性测定采用固体琼脂平板法,结果见图 4.

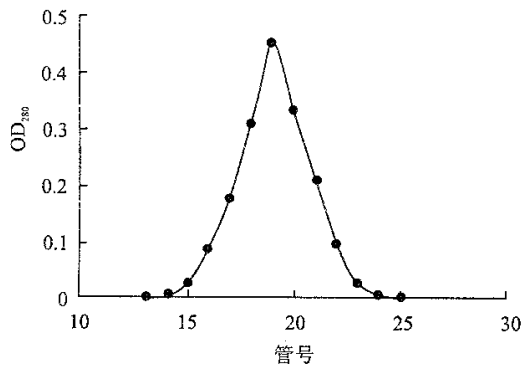


图 3 Sephadex G-75 柱层析

Fig.3 Column chromatography of lipase on sephadex G-75

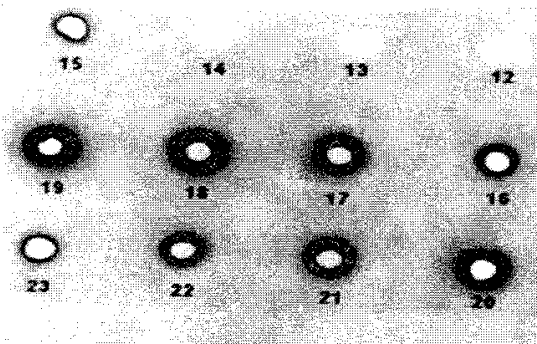


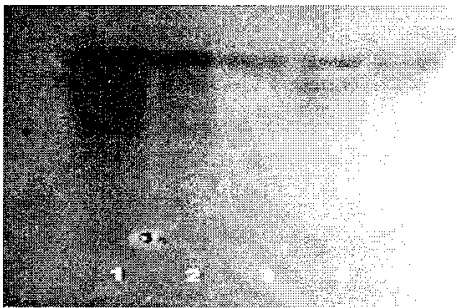
图 4 柱层析收集管样品溶液的酶活性分布

Fig.4 Distribution of enzyme activities in sample solutions collected with chromatography

可见,脂肪酶酶活性几乎都处于该峰中.收集具有酶活性的样品,冷冻干燥后得到纯度很高的粉状脂肪酶,PAGE 和 SDS-PAGE 都呈现单一脂肪酶蛋白条带.

2.3.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳酶活性蛋白条带的确定

将一定量各步纯化后的样品加入凝胶上样孔,4℃电泳以防止酶活性丧失,其它步骤按常规法进行.将电泳后的凝胶首先用蒸馏水漂洗 1~2 次,然后将该凝胶轻轻放在固体琼脂平板上,置 30℃恒温培养箱中反应,10 min 左右观察到有变色条带出现,结果见图 5.该方法显示的条带就是脂肪酶蛋白条带.然后将凝胶取下,用一般的方法染色,结果见图 6.所显示的条带包括脂肪酶蛋白质条带在内的所有蛋白质条带,两者对照后就可确定碱性脂肪酶的条带.



1-原酶液; 2-Phenyl; 3-DEAE I;
4-DEAE II; 5-Sephadex G-75

图 5 固体琼脂平板上脂肪酶活性条带

Fig.5 Active bands of lipase on agar plate



1-原酶液; 2-Phenyl; 3-DEAE I;
4-DEAE II; 5-Sephadex G-75

图 6 凝胶电泳一般染色的蛋白质条带

Fig.6 Protein bands on polyacrylamide gel electrophoresis with ordinary dyeing

从图 5、6 可见,原酶液中含有 3~4 条酶活性条带,明显少于凝胶电泳一般染色的蛋白质条带.通过 Phenyl-Sepharose CL-4B 柱层析以及 DEAE-Sepharose fast flow 柱层析,出现了两个具有酶活性的蛋白吸收峰 I 和 II.其中峰 I 只有一个活性条带,而峰 II 含有 3 个活性条带,但它们在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图上只有一个条带,说明 3 个酶活性组分相对分子质量相同,只是所带电荷不同.推测这可能是该微生物同一产酶基因在蛋白质翻译后处理加工所引起氨基酸残基所带电荷的差别所致.

3 结 论

平板扩散测定法是一种简便、灵敏、快速的直观方法,可用于产碱性脂肪酶菌种的筛选,酶样品溶液活性的快速粗略测定及聚丙烯酰胺凝胶电泳印迹.极大地减少了上述分析过程的工作量.

酶溶液平板测活性法的条件为:每孔加 30 μL 样品液,30℃恒温反应 24 h,测变色圈直径,折算成有效直径.聚丙烯酰胺凝胶电泳印迹法条件为:将电泳后的凝胶首先用蒸馏水漂洗 1~2 次,然后将

该凝胶放在固体琼脂平板上,置 30℃ 恒温培养箱中反应 10 min,用 SX-300 快速成像仪将条带记录下来,迅速将凝胶从平板上取下,用一般的蛋白质染色方法显示包括脂肪酶蛋白条带在内的所有蛋白条带.产酶微生物平板筛选法条件为:在产酶微生物分离培养基内添加酶作用底物和指示剂,作为产酶筛选培养基.将待筛选菌液经稀释后涂布于筛

选培养基上,30℃ 培养 3~4 d,挑取变色圈大的至斜面扩大培养.

本测定方法有推广应用的价值.除碱性脂肪酶外,这种方法改变琼脂平板中的底物以及 pH 等条件,可以很方便地用于其它酶活性的测定.

致谢 本研究得到复旦大学生物化学系黄伟达教授的热情支持和指导,在此深表谢意.

参考文献

[1]施巧琴.碱性脂肪酶的研究[J].微生物学报,1981,8(3):108~110

[2]郑建丰,邬敏辰.碱性脂肪酶测定方法的研究[J].江苏食品与发酵,1996(4):8~11

[3]JUNGE W,LEYBOLD K,KRAACK B. Influence of colipase on the turbidimetric determination of pancreatic lipase catalytic activity[J]. **J Clin Chem Clin Biochem**,1983,21:445~448

[4]AISAKA K,TERADA O. Purification and properties of lipoprotein lipase from *Rhizopus Japonicus*[J]. **Agric Biol Chem**,1980,44:799~805

[5]PLATTNER R D. High performance liquid chromatography of triglycerides[J]. **Methods Enzymol**,1981,72D:21~24

[6]KARNETOVA J,MATEJU J. Estimation of lipase activity by the diffusion plate method[J]. **Folia Microbiol**,1984,29:346~347

[7]KOUKER G,JAEGER K E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases[J]. **Appl Environ Microbiol**,1987,53:211~213

[8]MOURNEY A,KILBERTUS G J. Simple media conditioning stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils[J]. **Appl Bacteriol**,1976,40:47~51

[9]邬敏辰,张晓东.碱性脂肪酶提取的探讨[J].江苏食品与发酵,1995(4):4~8

[10]王重庆,李云兰,李德昌等.高级生物化学实验教程[M].北京:北京大学出版社,1994.1

[11]刘毓秀,程桂芳.蛋白质的凝胶电泳[M].北京:科学出版社,1994.1

[12]LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄[J]. **Nature**,1970,227:680~685

[13]KALPIT A.Characterization of extracellular lipase produced by *Aspergillus japonicus* [J]. **Biotechnol Appl Biochem**,1988,10:465~472

[14]SAMAD M Y. A plate assay for primary screening of lipase activity[J]. **J Microbiol Methods**,1989,9:51~56

(责任编辑:李春丽)