

文章编号 :1009-038X(2003)05-0102-02

草菇木聚糖酶 SDS-PAGE 后的复性及活性染色

胡沂淮, 李 迅, 邵蔚蓝

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要:草菇木聚糖酶经 SDS-PAGE 后在胶中能够原位复性,通过银染和刚果红活性染色比较,可确定该酶在胶中的位置.草菇木聚糖酶是单亚基蛋白,相对分子质量为 24 500.

关键词:草菇;木聚糖酶;SDS-PAGE;复性;活性染色

中图分类号:Q 556.2

文献标识码:A

Renaturation and Active Staining of Xylanase from *Volvariella volvacea* after SDS-PAGE

HU Yi-huai, LI Xun, SHAO Wei-lan

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

Abstract: Xylanase from *Volvariella volvacea* was shown to be renaturable after SDS-PAGE. Enzyme activity was detected *in situ* by Congo red staining. Compared with silver staining and Congo red staining, xylanase could be located in gel. Xylanase from *Volvariella volvacea* was monomeric enzyme and its molecular weight was 24500.

Key words: *Volvariella volvacea*; xylanase; SDS-PAGE; renaturation; active staining

SDS-PAGE 是根据蛋白质相对分子质量的大小,对蛋白质进行量化,比较及特性鉴定的一种经济、快速、而且可重复的分析方法^[1].但 SDS 可与蛋白质的疏水部分结合形成 SDS-蛋白质复合物,破坏蛋白质的空间折叠结构,使蛋白质变性,寡聚体解聚.特别是酶蛋白经过 SDS 处理,电泳后会丧失其原有的酶活性.因此,在 SDS-PAGE 后对 SDS 凝胶进行复性处理^[2],使酶蛋白进行原位复性,这不仅有利于在不纯的样品混合物中准确地确定特定的酶蛋白,并且能测定其相对分子质量.对于寡聚体酶,目前除了由 2 个相同亚基组成的 6-磷酸-葡萄糖脱氢酶是惟一经过 SDS-PAGE 后复性,并能恢复酶活性的寡聚体酶外,其他的寡聚体酶还没有 SDS-

PAGE 后复性,并能恢复酶活性的报道.所以,寡聚体酶经 SDS-PAGE 后复性变为单体酶,其几乎丧失了整个寡聚体酶的活性.因此,通过复性还可以知道蛋白的亚基组成情况^[3].

目前,已经有大量的酶,例如核酸酶、组蛋白、糖苷水解酶、脱氢酶和蛋白水解酶等,被发现在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后在胶中能够原位复性.它们的酶活通过将底物溶于胶中或将复性后的胶浸泡在含有底物的缓冲溶液中,反应后对胶染色测得^[4].木聚糖酶是半纤维素降解酶系中的主要水解酶之一,作者通过对草菇(*Volvariella volvacea*)木聚糖酶 SDS-PAGE 后的复性和活性染色,确定它在胶中的位置及相对分子质量和亚基组成.

收稿日期 2003-04-22; 修回日期 2003-06-11.

作者简介:胡沂淮(1970-)男,江苏淮安人,工学硕士.

万方数据

1 材料和方法

1.1 菌种

草菇(*Volvariella volvacea*)菌种由南京师范大学何强泰教授惠赠。

1.2 培养方法

试管斜面接种于种子培养基(羧甲基纤维素 5 g/L,木聚糖 5 g/L,蛋白胨 2 g/L,KH₂PO₄ 0.6 g/L,MgSO₄ 0.5 g/L,VB₁ 0.5 mg/L)中,40℃,130 r/min 摇瓶培养 4 d,然后将种子以体积分数 1% 接种量接种于 20 L 大罐培养基(30 g/L 稻草(NH₄)₂SO₄ 5 g/L,NaH₂PO₄ 5 g/L)中,在 25 L 发酵罐搅拌通气培养 4 d。

1.3 木聚糖酶的制备

木聚糖酶是离心后澄清的发酵液,它是经过硫酸铵沉淀,Phenyl-Agarose 疏水柱层析,DEAE-Sephacel 阴离子交换层析,凝胶过滤层析,CM-Agarose 阳离子交换层析,羟基磷灰石层析和 HPLC 等浓缩和纯化之后得到的部分纯化的木聚糖酶酶液。

1.4 SDS-PAGE

使用质量分数 12% 聚丙烯酰胺凝胶,在同一块聚丙烯酰胺凝胶上两边分别加相同的样品。电泳在 150 V、室温下进行,电泳 45 min^[5]。

酶样在上样前 100℃沸水浴中保温 2 min。

SDS-PAGE 后将胶从中间割开,分别进行银染(对照)和复性、活性染色。

1.5 银染

按以下方法银染^[5]:

(1)将 SDS-PAGE 后割下的一半凝胶用体积分数 50% 甲醛和体积分数 10% 醋酸溶液固定 1 h,其间换液 3 次;(2)用去离子水漂洗 30 min,换水 3 次;(3)将胶浸泡在染色液(100 mL 含 0.8 g/dL 硝酸银,21 mL 0.36 g/dL 氢氧化钠和 1.4 mL 体积分数 30% 氨水)中振摇染色 15 min;(4)用去离子水漂洗 2 min;(5)将胶在显色液(100 mL 中含 0.5 mL 1 g/dL 柠檬酸和 50 μL 体积分数 38% 甲醛)中显色,至出现清晰条带终止反应;(6)1% 醋酸终止反应;(7)在去离子水中漂洗凝胶 1 h,换水 3 次;(8)干胶保存。

1.6 酶的复性和活性染色

(1)将 SDS-PAGE 后割下的另一半凝胶用去离子水漂洗,在室温下用 10 倍体积的 0.04 mol/L、pH 6.2 的邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液振摇漂洗 3 次,每次 1 h;(2)将胶浸入含 0.5 g/dL 燕麦木聚糖 0.1 mol/L、pH 6.2 的邻苯二甲酸氢钾咪唑缓冲液中,50℃浸育 2 h;(3)胶用去离子水清洗干净;(4)将胶浸入 0.1 g/dL 刚果红溶液中染色 30 min;(5)胶用 1 mol/L 氯化钠溶液漂洗去刚果红染料;(6)用体积分数 5% 醋酸终止反应;(7)干胶保存。

2 结果与分析

虽然通过银染可以从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中灵敏地检测出样品中的微量蛋白质,但可能由于蛋白质样品不是很纯或一些其它原因,电泳后可能出现不止一条带或不出现带,这时,电泳就不能提供有价值的信息来确定所要的蛋白的性质。但通过复性和刚果红活性染色,可以非常灵敏地测出胶中复性后的酶的位置,从而得到酶的相对分子质量和它的亚基组成(见图 1)。从图中可以比较出银染和活性染色都出现的条带,这一条带代表了草菇木聚糖酶在胶中的位置。通过计算得草菇的木聚糖酶相对分子质量为 24 500。由于在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中草菇木聚糖酶能够复性,从而得出此酶是单亚基的蛋白。

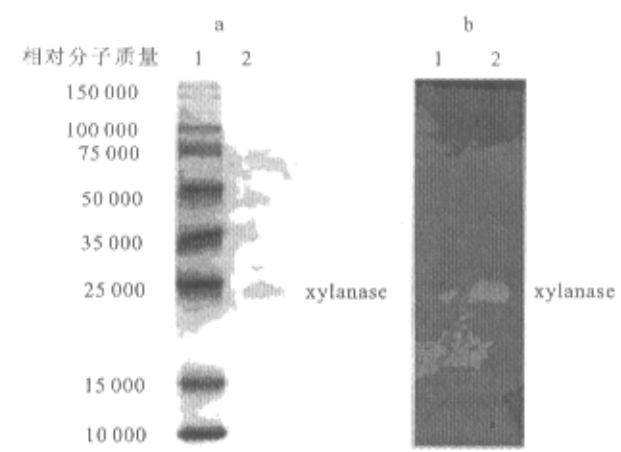


图 1 草菇木聚糖酶 SDS-PAGE(a. 银染;b. 活性染色。1. 标准相对分子质量蛋白,2. 蛋白样品)
Fig.1 SDS-PAGE of xylanase from *Volvariella volvacea* (a. silver staining;b. renaturing staining. 1. protein MW markers;2. sample)

参考文献:

[1]Blackshear P J. System for polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *Meth Enzymol*, 1984, 104: 237-255.
万方数据 (下转第 110 页)

4) 大力开展小麦加工副产品的综合利用。我国每年拥有 1 000 万 t 以上的麸皮资源,绝大部分用作饲料,价值很低,尚无理想的产品开发出来,亟待研究与开发。此外还有大量的小麦胚芽资源。由于大多数的面粉厂还没有很好的途径利用麦胚,而将其打入饲料,造成了宝贵资源的巨大浪费。因此,在未来 10 年要积极开发谷朊粉、小麦胚芽、小麦麸皮制品,从而最大程度地利用小麦资源,提高小麦资源的附加值^[9,11]。

2.3 玉米加工业的发展目标与战略

1) 玉米深加工产品总产值保持 8% 的增长速度,玉米深加工量达到 15%,其中柠檬酸、味精的产量稳中略升,玉米淀粉(含变性淀粉)有较大幅度增长,玉米淀粉糖和玉米酒精将是玉米加工产品中增

幅最大的。

2) 在玉米产区培植 5~10 个 50 万 t 以上,集饲料、淀粉(淀粉糖)及酒精等化工产品为一体的、拥有先进工艺与装备的玉米加工规模化龙头企业。

3) 继续完善玉米及玉米产品的质量标准体系,包括强化玉米安全标准、制订玉米新产品标准、细化现有标准的质量指标和提高指标的可操作性。

4) 改进现有玉米加工企业的技术装备、工艺水平和管理水平,提高玉米综合利用水平和总干物回收率,引进设备达到 98% 以上,国产设备达到 96% 以上。

5) 研究开发玉米加工用的新酶、新菌种、新产品和新的应用 3~5 项,申请专利 3~5 个,使我国玉米加工业科技水平达到美国 90 年代中期水平^[12]。

参考文献：

[1] 孙加龙. 日本稻谷处理加工技术[DB]. <http://www.cngrain.com>. 2001-10-15.
[2] 长谷川信弘. 有孔淀粉の性质とイマクロカプセル化への利用[J]. 食品工业(日),1998,18:42-50.
[3] 张上游. 泰国大米加工的质量控制[J]. 世界农业,2000,4:22-25.
[4] 刘桂才. 今年国内大米供求情况分析[中华粮网] [DB]. <http://www.cngrain.com>. 2001-10-15.
[5] 苗苗. 我国稻谷加工技术现状及展望[DB]. <http://www.cngrain.com>. 2001-10-15.
[6] 白清美. 加入世贸和粮食市场化后我国粮油工业发展战略的几个问题[J]. 粮食与饲料工业,2002,5:31-33.
[7] 万宝瑞. 农产品加工业的发展与政策[M]. 北京:中国农业出版社,1999.
[8] 农业部. 新阶段农业结构调整的实践[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
[9] 谷树忠. 农业自然资源可持续利用[M]. 北京:中国农业出版社,1999.
[10] 丁声俊. 中国的小麦结构与迎接“入世”挑战[J]. 粮油食品科技,2001,9(1):42-43.
[11] 王晓燕. 全国小麦品种品质检测报告[J]. 河北农业大学学报,1995,18(1):1-9.
[12] 辛文利,祁适雨. 关于我国小麦品种品质存在的问题及建议[J]. 黑龙江农业科学,1998,4:44-46.
[13] 中国食品科学技术学会. 国际小麦、玉米、大豆生产及贸易概况[J]. 中国农业信息快讯,2003,(2):9-11.
[14] 国家发展计划委员会.“十五”规划战略研究[M]. 北京:中国人口出版社,2000.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 103 页)

[2] Spanos A, Huebscher U. Recovery of funtional proteins in sodium dodecyl sulfate gels[J]. Meth Enzymol, 1983, 91:263-277.
[3] Sanford A L, Sylvia S S. Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate[J]. J Biol Chem, 1980, 255(15):7467-7473.
[4] Pierre B. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gel using congo red-stained agar replicas[J]. Anal Biochem, 1983, 131:333-336.
[5] Daniel M B, Michael D R, Stuart J E. Protein Method[M]. New York:Wiley-Liss, Inc. 1996. 108-139.

(责任编辑:杨 萌)