

文章编号:1673-1689(2007)06-0090-05

## 猪心苹果酸脱氢酶的分离纯化及性质

张大伟, 杨海麟, 王武

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 采用组织破碎, 二度硫酸铵盐析, DEAE Sepharose F. F. 离子交换层析及 Sephadex G-75 Fine 凝胶过滤等纯化方法, 从猪心中提取得到了苹果酸脱氢酶。提取纯化的苹果酸脱氢酶经 SDS-PAGE 测定显示为单一条带, 相对分子质量为 34 000。酶活回收率为 57.99%, 最适 pH 为 8.0, 最适温度为 50 °C。

**关键词:** 猪心; 苹果酸脱氢酶; 柱层析; 酶学性质

**中图分类号:** Q 55

**文献标识码:** A

## Preparation and Characterization of Malate Dehydrogenase from Swine Heart

ZHANG Da-wei, YANG Hai-lin, WANG Wu

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** By tissue crushing, ammonium sulfate dual-precipitation and purification through DEAE Sepharose F. F./Sephadex G-75 filtration, the malate dehydrogenase (MDH) from swine heart was prepared. The purified MDH was illustrated as a single band in SDS-PAGE. The molecular weight of MDH subunit was 34 000. The recovery of MDH activity was 57.99%. The optimum pH for MDH was 8.0, and the optimum temperature for MDH was 50 °C.

**Key words:** Swine heart; malate; chromatography; character of enzyme

苹果酸脱氢酶(Malate Dehydrogenase, MDH)的分类名为 L-苹果酸:辅酶 I 氧化还原酶(L-Malate:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase), 催化苹果酸与草酰乙酸之间的氧化脱氢或还原加氢的可逆反应, 是三羧酸循环的重要的氧化还原酶, 同时也是常用的临床诊断用酶, 亦是 T-MD 和 M-MD 试剂盒的生产的主要原料。主要用于生化研究, 苹果酸的测定, 急性心肌梗塞和肝脏疾病的诊断<sup>[1]</sup>。目前国内尚无苹果酸脱氢酶产品生产<sup>[2]</sup>。

苹果酸脱氢酶广泛分布于动物各组织, 尤以心、肝、肾、骨骼肌中最为丰富<sup>[3]</sup>。目前对于苹果酸

脱氢酶的研究主要集中在分子生物学领域<sup>[4]</sup>, 国内曾报道过张元亮等人对猪心苹果酸脱氢酶的研究<sup>[5]</sup>, 但是其提取方案复杂而且酶活回收率不高。作者采用更为简便的方法, 获得了纯度和回收率更高的苹果酸脱氢酶生化制备工艺。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料

1.1.1 猪心 新鲜猪心: 购自江苏无锡青山湾菜市场。

收稿日期: 2006-10-25.

作者简介: 张大伟(1982-), 男, 江苏扬州人, 生物酶工程硕士研究生.

通讯作者: 王武(1952-), 女, 福建福州人, 教授, 博导, 主要从事微生物酶工程研究. Email: wangwu@jiangnan.edu.cn

**1.1.2 主要试剂** NADH,上海生工,Amresco 进口分装产品;草酰乙酸,Alfa Aesar 进口分装产品;DEAE Sepharose F. F 离子交换 Sephadex G-25 Sephadex G-75,Pharmacia 进口分装。

**1.2 实验方法**

**1.2.1 粗酶液的制备** 500 g 新鲜猪心,水洗去血,除去脂肪和结缔组织,用绞肉机绞碎。悬浮于 1 L pH 7.5、0.01 mol/L 的磷酸钾缓冲液中,匀浆过夜后,10 000 r/min 离心 10 min,弃去沉淀,上清液即为粗酶液。

**1.2.2 硫酸铵沉淀** 在 4 °C 条件下,将饱和硫酸铵溶液缓慢加入粗酶液至硫酸铵饱和度为 70%,过夜后 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,测上清液酶活力和蛋白质含量;再缓慢搅拌上清液并添加饱和硫酸铵至质量分数 90%,过夜后 15 000 r/min 离心 15 min,取沉淀用缓冲液溶解,测溶解后的苹果酸脱氢酶酶活力和蛋白质浓度。

**1.2.3 离子交换柱层析** 离子交换剂 DEAE Sepharose F. F. (26 mm × 30 cm),体积流量 2 mL/min,用 pH 7.5、0.01 mol/L 磷酸钾缓冲液平衡层析柱,采用 0~0.5 mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱,活性部分收集。

**1.2.4 G75 凝胶分子筛柱层析** Sephadex G75 Fine 凝胶 (10 mm × 30 cm),体积流量 0.2 mL/min,用 pH 7.5、0.01 mol/L 的磷酸钾缓冲液平衡层析柱,洗完 20 个柱体积后,开始上样、洗脱,收集有酶活的洗脱液。

**1.2.5 苹果酸脱氢酶 SDS—PAGE 电泳分析** SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS—PAGE),采用不连续胶的 SDS—PAGE,凝胶质量 8 g/dL~12 g/dL,凝胶内含 0.1% 的 SDS。电极缓冲液为 Tris—甘氨酸 (pH 8.3,0.25 mol/L,含 0.1% 的 SDS)。蛋白质在凝胶上固定,凝胶放入考马斯亮兰 G250 染色液中染色,弃去染色液后,用脱色液漂洗凝胶直至背景完全脱去。

**1.2.6 酶活力测定方法** MDH 在催化草酰乙酸转化为苹果酸的同时,将 NADH 氧化为 NAD,使得以 NADH 在 340 nm 处吸光度的变化即可算出酶活。酶活单位定义为 25 °C,每分钟氧化 1 μmol 的 NADH 所需的酶量<sup>[6]</sup>。

酶活公式:  $19.614 \times \Delta A_{340} \times \text{稀释倍数}$  ( $\Delta A$  为每分钟吸光值的减少量)

**1.2.7 蛋白质含量测定方法** 用 Bradford 测定蛋白质含量,以牛血清蛋白为标准样<sup>[7]</sup>。

**2 结果与讨论**

**2.1 硫酸铵沉淀**

在 4 °C 条件下,将固体硫酸铵粉末缓慢加入粗酶液至硫酸铵饱和度为 70%,过夜后 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,测上清液酶活力和蛋白质含量,如图 1 所示。可以看出,当粗酶液硫酸铵饱和度为 50%~70% 时,酶主要存在于上清液中,在硫酸铵饱和度到达 70% 以后,上清液中酶活突然下降。由此可见 70% 硫酸铵质量分数是 MDH 一次盐析的折点,而总蛋白质质量浓度的变化没有出现折点,比活的变化趋势呈现先升高,至硫酸铵质量分数 70% 时,MDH 比酶活达到最大,而后急剧下降。综合考虑一次盐析对苹果酸脱氢酶的活力、蛋白浓度、比活力三因素的影响,选取一次盐析硫酸铵质量分数为 70%。

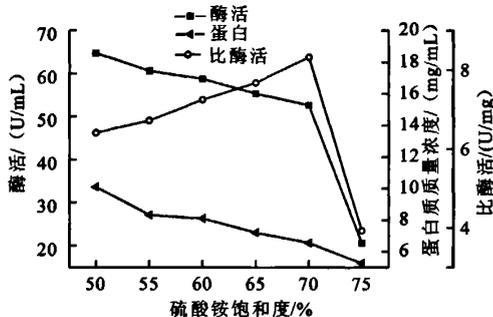


图 1 MDH 的硫酸铵一级盐析曲线

Fig. 1 MDH First salting-out curve by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

一次盐析后的上清液样品采取透析袋浓缩 (把样品放在透析袋中放到 PEG 20,000 中浓缩) 后,进行硫酸铵二次盐析,离心后收集沉淀,并用缓冲液溶解,得到的盐析曲线见图 2。

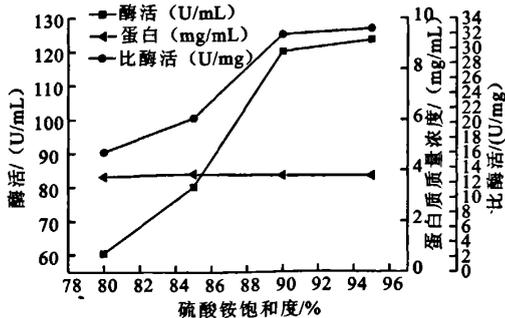


图 2 MDH 的硫酸铵二次盐析曲线

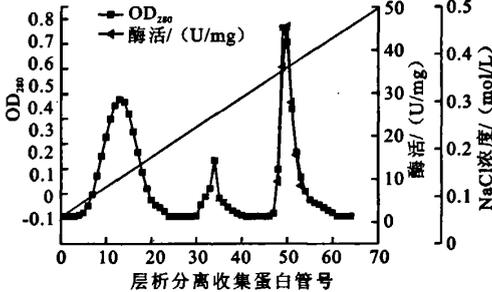
Fig. 2 MDH second salting-out curve by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

可见随着硫酸铵质量分数的增加,沉淀物中酶活升高,蛋白质含量变化不明显,而比活的变化趋势和酶活相当,而硫酸铵质量分数达 90% 时,酶活、

比活皆达到最高值,而后几乎不再变化,证明在质量分数达到90%以后,蛋白质全部被沉淀出来,因此二次盐析硫酸铵质量分数定为90%。

2.2 离子交换柱层析

二次盐析的酶液经过透析除盐后,进行离子交换层析。苹果酸脱氢酶的等电点在6.1左右,其最高pH值为7.8,用DEAE阴离子交换剂进行纯化分离,纯化结果如图3所示。在盐浓度达到0.5 mol/L左右,检测到洗脱液中酶活开始升高。



柱条件:柱大小:26 mm×30 cm; 上样量:10 mL; 体积流量 2 mL/min

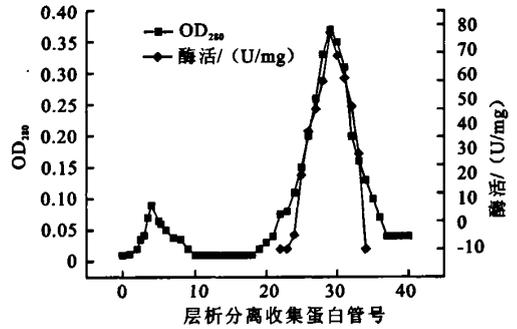
图3 猪心肌 MDH DEAE-Sepharose 离子交换层析结果

Fig. 3 Fraction of porcine MDH by DEAE-Sepharose chromatography

2.3 Sephadex G75 凝胶过滤

为了得到纯度很高的苹果酸脱氢酶,在经过了

离子交换柱层析后得到的苹果酸脱氢酶酶液中大部分杂酶已经去除,只剩下一些相对分子质量小的酶由于带电性质和苹果酸脱氢酶相似,所以要再次通过 Sephadex G75 分子筛去除,纯化结果如图4所示。



柱条件:柱大小:10 mm×30 cm; 上样量:2 mL; 体积流量 0.2 mL/min

图4 猪心肌 MDH G75 凝胶过滤层析结果

Fig. 4 Fraction of porcine MDH by G75-Sephadex chromatography

2.4 苹果酸脱氢酶的纯化结果

通过对各种分离方法的研究,苹果酸脱氢酶的纯化结果如表1所示。

表1 猪心苹果酸脱氢酶的纯化结果

Tab. 1 Purification of malate dehydrogenase

纯化步骤	总酶活/(U/mL)	总蛋白质质量/mg	比活/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	11 601.7	1 173.04	9.89		100
70%硫酸铵盐析	10 406.8	390.55	26.64	2.69	89.6
90%硫酸铵盐析	9 724.43	79.42	122.44	12.38	83.8
离子交换层析	7 779.2	7.755	1 003.12	101.42	67.05
G75 凝胶过滤	6 728.5	5.587	1 204.31	121.77	57.99

2.5 苹果酸脱氢酶的 SDS-PAGE 电泳分析

把最后所得成品酶液进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果见图5。

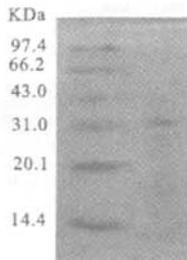


图5 苹果酸脱氢酶的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 5 SDS-PAGE of MDH

从图5中可以看出,多步分离纯化后的苹果酸脱氢酶基本上为单一谱带。根据标准蛋白质相对分子质量与相对迁移率的关系,可初步测算出,苹果酸脱氢酶的亚基相对分子质量为34 000,与下文测定的相对分子质量68 000不同,但两个数值大约是2倍关系,因此,可以初步推断本实验从猪心中提取的苹果酸脱氢酶含有两个非共价结合的亚基,且每个亚基的相对分子质量大致为34 000。

2.6 酶学性质研究

2.6.1 苹果酸脱氢酶的相对分子质量 采用凝胶 Sephadex G75 (10 mm×30 cm)检测苹果酸脱氢酶的相对分子质量。所使用的标准分子质量蛋白质

为胰蛋白酶(23 300),胃蛋白酶(35 000),卵清蛋白(45 000),牛血清白蛋白(68 000)。各蛋白质配制成 1 mg/mL 的溶液,各取 0.5 mL 上样,用紫外检测仪在 280 nm 处检测出峰情况,并求得洗脱体积  $V_e$ 。作出  $V_e$ —logM 标准曲线如图 6 所示。

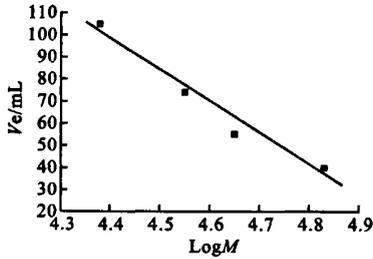


图 6 相对分子质量标准曲线

Fig. 6 Standard curve of molecular weight

线性回归后得到  $V_e$ —logM 标准曲线为:

$$Y = -148.97x + 753.42 \quad R^2 = 0.9629$$

式中:  $x$  为相对分子质量的对数  $\log M$ ;  $Y$  为洗脱体积  $V_e$ (mL)

将样品苹果酸脱氢酶在相同的条件下上样和洗脱,测得洗脱体积  $V_e$  为 33.5 mL,代入标准曲线求得该酶的相对分子质量为 68 000。

**2.6.2 苹果酸脱氢酶的最适温度及温度稳定性研究** 由图 7 和图 8 可以看到,在 pH 7.5 的条件下苹果酸脱氢酶活力的最适温度为 50 °C, 40 °C 处理 10 min 仍可保持 80% 的酶活力,但是 50 °C 处理则使得酶活力急剧下降。

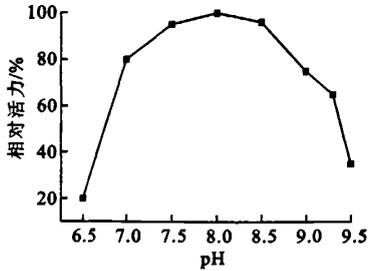


图 7 MDH 的 pH 稳定性

Fig. 7 Effect of pH on the MDH activity

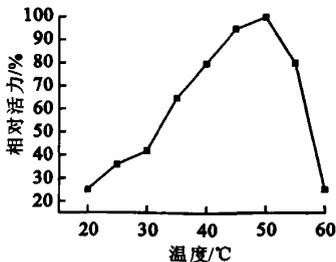


图 8 MDH 的最适温度

Fig. 8 Effect of temperature of MDH

**2.6.3 苹果酸脱氢酶的最适 pH 及 pH 稳定性研究** 由图 9 和图 10 可以知道,MDH 的最适 pH 为 8,MDH 在 pH 为 7 或 pH 为 9 的条件下存放 20 h 后,还能保持 60% 的活力。

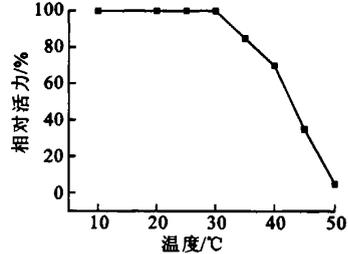


图 9 温度稳定性 (pH 7.5 0.1 mol/L 磷酸钾处理 10 min)

Fig. 9 The stability under different temperature (pH 7.5) treated with potassium phosphate buffer for 10 min

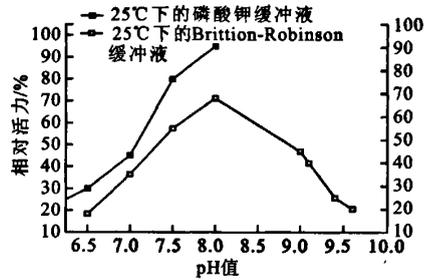


图 10 MDH 的最适 pH 值

Fig. 10 The optimum pH of MDH

**2.6.4 化合物及金属离子对苹果酸脱氢酶的影响**<sup>[6]</sup> 由表 2 可知,FeCl<sub>3</sub>、CoCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub> 对苹果酸脱氢酶有激活作用,而 AgNO<sub>3</sub> 和 HgCl<sub>2</sub> 对此酶有很强的抑制作用。

表 2 化合物及金属离子对 MDH 活性影响

Tab. 2 Effect of the compound and ion on MDH activity

化合物	浓度/ mmol/L	相对活 性/%	化合物	浓度/ mmol/L	相对活 性/%
空白	2.0	100	CuSO <sub>4</sub>	2.0	60
金属离子	2.0	100	AgNO <sub>3</sub>	2.0	0
MgCl <sub>2</sub>	2.0	97	HgCl <sub>2</sub>	2.0	0
CaCl <sub>2</sub>	2.0	95	PCMB	0.1	1.5
Ba(OAc) <sub>2</sub>	2.0	96	EDTA	5.0	100
FeCl <sub>3</sub>	2.0	101	NaF	2.0	100
CoCl <sub>2</sub>	2.0	102	NaN <sub>3</sub>	2.0	95
MnCl <sub>2</sub>	2.0	102	SDS	0.05%	20

### 3 结 语

经过深入研究猪心苹果酸脱氢酶的生化提取纯化方法,得到一条高回收率、高纯化率的 MDH 提取纯化工艺路线:猪心→绞碎匀浆,离心去除杂质→上清液以质量分数 70% 的硫酸铵一次盐析→上清液经质量分数 90% 的硫酸铵二次盐析→透析

脱盐→DEAE Sepharose F. F. 离子交换柱层析→Sephadex G75 凝胶过滤。以此工艺为基础,进行初步放大实验,最终 MDH 回收率可达 57.99%。且进一步对酶反应条件进行研究,其最适 pH 为 8,最适温度为 50 °C<sup>[9]</sup>。

进一步优化本工艺路线,有望形成猪心苹果酸脱氢酶的生产工艺,填补试剂酶生产的国内空白。

### 参考文献(References):

- [1] Aornikunнас J, Palva A. The malate dehydrogenase gene (mdh) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial mdh gene[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(6):665-671.
- [2] 袁勤生. 现代酶学[M]. 上海:华东理工大学出版社,2001.
- [3] 刘桂琴. 兔子和小鼠不同组织苹果酸脱氢酶活性的研究[J]. 南开大学学报:自然科学版,2005,38(5):44-47.  
LIU Gui-qin. A Reserch of Malate Dehydrogenase Activity in Various Tissues on Rabbit and Mouse[J]. *Journal of NanKai University: Science and Natural Edition*, 2005, 38(5):44-47. (in Chinese)
- [4] 刘艳荷,胥保华. 西方蜜蜂 6 个亚种正反交苹果酸脱氢酶 II 基因的遗传差异[J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2003, 21(2):23-27.  
LIU Yan-he, XU Bao-hua. Genetic Differences of Malate Dehydrogenase(MDH) II Genes in Recprocal Combinations of Six Western Honeybee Subspecies[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science*. 2003, 21(2):23-27. (in Chinese)
- [5] 张元亮,王云山. 猪心线粒体苹果酸脱氢酶制备[J]. 中国生化药物杂志,1994,15(1):24-27.  
ZHANG Yuan-liang, WANG Yun-shan. The Preparation of Malate Dehydrogenase of Mitochondrial Form from Pig Heart[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 1994, 15(1):24-27. (in Chinese)
- [6] 吉尔伯特 G G. 酶法分析手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983.
- [7] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [8] Wayne A Jense. Stability studies on pig heart mitochondrial malate dehydrogenase; the effect of salts and amino acids[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1296:23-34.
- [9] 李云志,曾凡骏. 元宝枫叶总黄酮的提取研究[J]. 食品与生物技术学报,2006, 25(1):27-30.  
LI Yun-zhi, ZENG Fan-jun. The Extraction of Flavonoids From the Leaves of *Acer truncatum* Bunge[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(1):27-30. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)