

文章编号:1673-1689(2008)05-0057-05

猪心肌苹果酸脱氢酶的制备及应用

龚 韧^{1,2}, 孙 艳^{1,2}, 王 静^{1,2}, 霍惠芝^{1,2}, 杨海麟^{1,2}, 王 武^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 设计并优化了从猪心中提取高纯度苹果酸脱氢酶的技术路线, 采用组织破碎、二度硫酸铵盐析、DEAE Sepharose F. F. 离子交换层析、Phenyl Sepharose 6 F. F. 疏水层析及 Sephadex G-75 Fine 凝胶过滤等方法进行分离纯化, 苹果酸脱氢酶比酶活达 1 212.97 U/mg, 纯化倍数达 122.64 倍, 酶活力收率为 53.64%。Sephadex G-75 Fine 凝胶过滤和 SDS-PAGE 电泳结果显示纯化的苹果酸脱氢酶相对分子质量约为 69 000, 含有 2 个亚基, 每个亚基的相对分子质量约为 34 000。以制备的苹果酸脱氢酶和谷草转氨酶配成双酶反应体系, 对葡萄酒中 L-苹果酸的含量进行了测定; 通过标准样品和葡萄酒样品精密度及回收率(93.2%~104%)实验。

关键词: 苹果酸脱氢酶; 柱层析; 纯化; L-苹果酸测定

中图分类号: Q 554.9

文献标识码: A

Purification and Application of Malate Dehydrogenase from Swine Heart with High Purity

GONG Ren^{1,2}, SUN Yan^{1,2}, WANG Jing^{1,2}, HUO Hui-zhi^{1,2}, YANG Hai-lin^{1,2}, WANG Wu^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The extraction of Malate dehydrogenase (MDH) from Swine heart was designed and optimized, by tissue crushing, ammonium sulfate dual-precipitation and purification through DEAE Sepharose F. F., Phenyl Sepharose 6 F. F. hydrophobic chromatography and Sephadex G-75 Fine. The final specific activity of MDH was up to 1 212.97 U/mg and 122.64-fold purification was obtained with enzymatic activity recovery of 53.64%. The molecular weight of malate dehydrogenase was 69 000, consists of two subunits, and the molecular weight of single subunits was about 34 000 by analysis from Sephadex G-75 Fine gel and SDS-PAGE. A new method was developed for assaying L-malic acid in wine by MDH and GOT dual-enzymatic system. The assay was linear over L-malic acid of 0.005 to 0.3 g/L at the temperature of 25 °C and detective wavelength at 340 nm. It was proved to be simply and accurately applicable to L-malic acid determination in wine based on the precision and recovery(93.2%~104%).

Key words: Malate dehydrogenase; chromatography; purification; L-malic acid determination

收稿日期: 2007-09-21.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10Z305).

作者简介: 龚韧(1981-), 男, 湖北黄冈人, 发酵工程硕士研究生.

* 通讯作者: 王武(1952-), 女, 福建福州人, 教授, 博士生导师, 主要从事遗传工程相关研究. Email: wangwu@jiangnan.edu.cn

苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)是生物体三羧酸循环(TCA)的关键酶之一。它在柠檬酸循环中催化苹果酸形成草酰乙酸,也可以催化草酰乙酸形成苹果酸。而草酰乙酸是生物体内生化反应的一个重要中间产物,连接多条重要的代谢途径,是氨基酸形成所必需的碳骨架的主要来源之一^[1]。苹果酸脱氢酶广泛分布于动物各组织,尤以心、肝、肾、骨骼肌最为丰富^[2]。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^[3],国内曾报道过张元亮等人对猪心苹果酸脱氢酶的提取纯化研究^[4],但是其提取方法复杂而且比酶活和回收率不高。作者采用更为简便的方法,获得了比酶活和回收率更高的苹果酸脱氢酶生化制备工艺,到目前为止国内尚无苹果酸脱氢酶产品生产^[5],作者的研究有望为该酶的工业化生产提供理论依据。

苹果酸脱氢酶在临床诊断中有着广泛的用途,可用于心肌梗塞、急性实质性肝损伤、肝癌、肺癌、白血病的早期诊断和鉴别诊断。而将苹果酸脱氢酶应用于发酵过程中有机酸的检测,如L-苹果酸、醋酸、柠檬酸的检测,在国内还未见报道。作者以制备的苹果酸脱氢酶和商品化谷草转氨酶为双酶反应体系,对葡萄酒中L-苹果酸的含量进行了检测,结果快速、准确。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 猪心 新鲜猪心。

1.1.2 主要试剂 试剂Ⅰ:0.05 mol/L 甘氨酸—NaOH 缓冲液,pH 值为 10.0,每 30 mL 含 L-谷氨酸 440 mg 及稳定剂;试剂Ⅱ:NAD⁺冻干粉 420 mg(Sigma 公司),使用前加入 6 mL 去离子水溶解;试剂Ⅲ:谷草转氨酶悬浮液 5 mL(Calbiochem 公司),2 500 U。试剂Ⅳ:猪心中提取的苹果酸脱氢酶溶液,16 500 U/mL;NADH:上海生工,Amresco 进口分装产品;草酰乙酸:Alfa Aesar 进口分装产品。

1.2 制备方法

1.2.1 酶活力测定 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 NADH 在 340 nm 处的吸光度不断降低,连续测定酶反应过程中 340 nm 处吸光度的变化即可算出酶活。酶活力单位(U)定义为:在 25 ℃,pH 值为 7.5 下,每分钟氧化 1 μmol 的 NADH 所需的酶量^[6]。

酶活公式: $9.807 \times \Delta A_{340} / \text{min} \times \text{稀释倍数} (\Delta A \text{ 为每分钟吸光值的降低值})$ 。

1.2.2 蛋白含量测定 用 Bradford 检测法^[7]测定,以牛血清蛋白为标准样。

1.2.3 粗酶液的制备 新鲜猪心,水洗去血,除去脂肪和结缔组织,用绞肉机绞碎。在 4 ℃ 条件下,悬浮于适量 pH 值为 7.5,0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液^[8]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。粗酶液用硫酸铵盐析沉淀,一次盐析硫酸铵饱和度为 70%,二次硫酸铵饱和度为 90%,方法见参考文献^[9]。

1.2.4 离子交换层析 DEAE Sepharose F. F. 离子交换层析(26 mm×30 cm):体积流量 2 mL/min,用 pH 值为 7.5,0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液平衡层析柱,采用磷酸钾缓冲液(0~0.5 mol/L,NaCl)进行梯度洗脱,收集活性吸收峰。

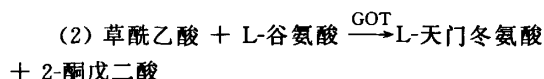
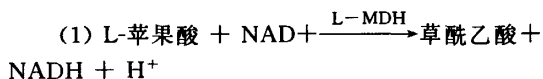
1.2.5 疏水柱层析 Phenyl Sepharose 6 F. F. 疏水层析(16 mm×30 cm):体积流量 3 mL/min,平衡液为磷酸钾缓冲液(0.5 mol/L,(NH₄)₂SO₄),苹果酸脱氢酶不吸附,直接流出,收集活性吸收峰。

1.2.6 G-75 凝胶分子筛柱层析 Sephadex G-75 Fine 凝胶过滤层析(10 mm×50 cm):体积流量 0.2 mL/min,用 pH 7.5,0.1 mol/L 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,收集活性吸收峰。

1.2.7 苹果酸脱氢酶相对分子质量和纯度的测定 Sephadex G-75 凝胶过滤法和 SDS-PAGE 法。SDS-PAGE 法进行,分离胶为 10 g/dL^[10]。

1.3 葡萄酒中 L-苹果酸的测定

1.3.1 原理 在 L-苹果酸脱氢酶(L-MDH)的催化作用下,L-苹果酸被烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)氧化生成草酰乙酸,然后加入过剩的 L-谷氨酸,在谷草转氨酶的作用下,生成 L-天门冬氨酸和 2-酮戊二酸,利用下述(1),(2)两反应偶联进行及 NADH 在 340 nm 处特异性的吸收峰,通过测定反应体系在 340 nm 处光吸收的增加值,得到样品中 L-苹果酸的含量。



1.3.2 操作方法 样品管中依次添加蒸馏水 2.00 mL、试剂Ⅰ0.10 mL、试剂Ⅱ0.10 mL、试剂Ⅲ0.02 mL、样品 0.10 mL 混匀,对照管为蒸馏水 2.10 mL、试剂Ⅰ0.10 mL、试剂Ⅱ0.02 mL 及样品 0.10 mL,分别水浴保温约 3 min 后,测定溶液的吸光度值 A₁,然后立即添加试剂Ⅳ0.02 mL 混匀,水浴保温约 5 min 后,测定

溶液的吸光度值 A_2 。计算空白及样品的吸光度差 $A_2 - A_1$, 并计算 $\Delta A = \Delta A_{\text{样品}} - \Delta A_{\text{空白}}$

控制加样量及浓度, 使 $\Delta A > 0.100$ 个吸光单位。样品中 L-苹果酸的质量必须控制在 $0.5 \sim 30 \mu\text{g}$ 之间。

1.3.3 回收率和精密度实验 在已知 L-苹果酸含量的样品溶液中精准加入一定量的标准 L-苹果酸溶液, 进行 3 次平行测定, 分别计算样品的回收率。

取不同品牌的 5 种葡萄酒, 各进行 3 次平行测定。计算变异系数(CV)。变异系数, 也称相对标准偏差, 能较好地反映测定结果的精密度。精密度计算公式见参考文献[11]。

2 结果与讨论

2.1 离子交换柱脱盐浓缩

离子交换层析是一种常用的蛋白分离工具, 具有上样量大、纯化效果显著等优点, 可用于工业化大规模生产。苹果酸脱氢酶的等电点大约在 6.1 左右, 因此可应用 DEAE 阴离子交换剂进行分离纯化。将二次盐析的酶液经过透析除盐后, 进行离子交换层析, 纯化结果如图 1 所示。在盐浓度达到 0.3 mol/L 时, 检测到洗脱液中酶活开始升高。经过 DEAE 离子交换柱层析后, 苹果酸脱氢酶的比酶活比先期经盐析沉淀的粗酶液提高了近 10 倍。

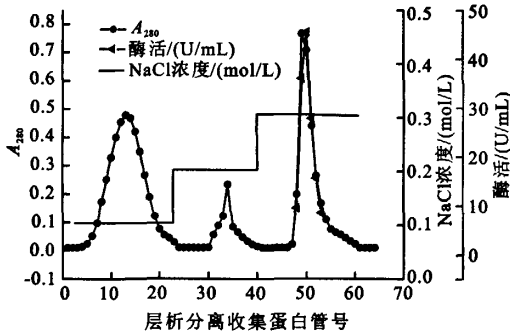


图 1 梯度洗脱下 DEAE-Sepharose 离子交换层析图

Fig.1 DEAE-Sepharose chromatography from gradient elution

2.2 疏水层析去杂蛋白

经过 DEAE 离子交换层析柱之后, 苹果酸脱氢酶的比酶活有了很大幅度的提高, 但仍达不到检测用酶的要求, 因此, 需进一步除去杂蛋白。疏水层析是近几年来新发展起来的一种分离技术, 它主要是利用盐-水体系中样品分子的疏水基团和层析介质的疏水配基之间疏水力的不同而进行分离的技术。当体系中盐浓度为 0.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时, 苹果酸脱氢酶没有结合在疏水柱上, 但发现大部分

杂蛋白被疏水柱吸附, 此时, 苹果酸脱氢酶的收率达到了 90% (相对上样前), 比酶活也比上一步提取有了很大的提高。结果如图 2 所示。

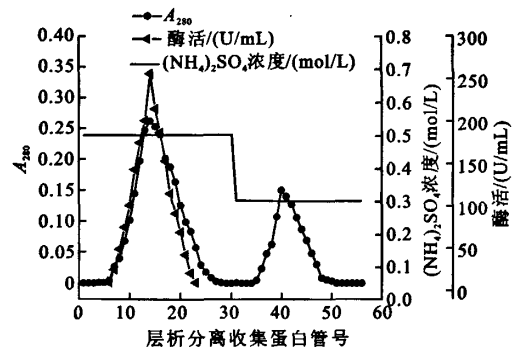


图 2 不同盐浓度下疏水层析图

Fig.2 HIC on different $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration

2.3 Sephadex G-75 凝胶层析去除小分子杂蛋白

为了得到纯度更高的苹果酸脱氢酶, 在经过了离子交换柱层析后得到的酶液中大部分杂酶已经去除, 只剩下一些由于带电性质和苹果酸脱氢酶相似的分子量小的酶, 所以要再次通过 Sephadex G-75 分子筛去除, 纯化结果如图 3 所示。

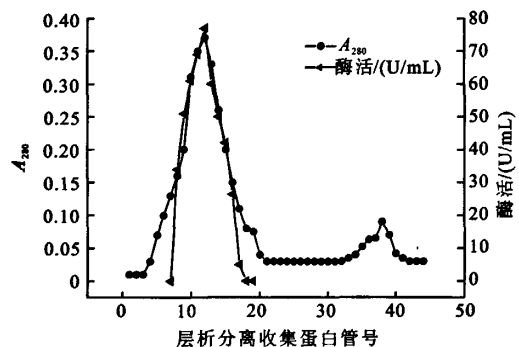


图 3 Sephadex G-75 凝胶过滤层析图

Fig.3 Sephadex G-75 gel chromatography

2.4 MDH 的纯化结果

通过逐步分离纯化, 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)	总蛋白质量/(mg)	比活/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	11 601.7	1173.04	9.89	—	100
离子交换层析	7779.2	7.755	1003.12	101.42	67.05
疏水层析	7012.6	6.372	1100.53	111.27	60.44
G75 凝胶过滤	6 223.8	5.131	1212.97	122.64	53.64

从表 1 可以看出, 经过一系列的纯化操作, 粗酶液的酶活力和比活力都提高到一定的水平, 酶活力达 $6 223.8 \text{ U/mL}$, 比活达 $1 212.97 \text{ U/mg}$, 得到

了酶活和比活都比较高的酶,结果相对于粗酶液提纯倍数达到 122.64 倍,收率也达到 53.64%。

2.5 相对分子质量测定与双亚基推测

以标准蛋白质的洗脱体积 V_e 为纵坐标,以相应的标准蛋白质的 $\lg M_r$ 为横坐标,作相对分子质量标准曲线,如图 4 所示。

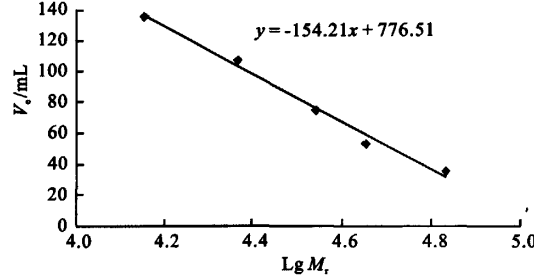


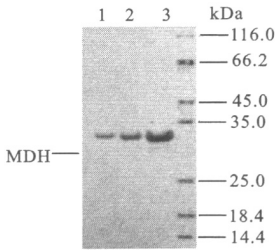
图 4 标准蛋白质相对分子质量对数与洗脱体积关系
Fig. 4 Standard curve of molecular weight

线性回归后得到 V_e - $\lg M_r$ 标准曲线为: $y = -154.21x + 776.51$

x 为相对分子质量的对数 $\lg M_r$; y 为洗脱体积 V_e (mL)

将样品酶液在相同的条件下上样和洗脱,测得洗脱体积 V_e 为 30.3 mL,代入标准曲线求得该酶的相对分子质量为 69 000。

把苹果酸脱氢酶进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果见图 5,根据标准蛋白质相对分子质量与相对迁移率的关系,可初步测算出样品条带的相对分子质量为 34 000,与凝胶过滤测定的结果相比,两个数值大约是 2 倍关系,因此,可以初步推断猪心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。这与文献报道的植物梭梭苹果酸脱氢酶的相对分子质量和亚基结构相似^[12]。



1 为稀释 50 倍样品;2 为稀释 30 倍样品;3 为稀释 10 倍样品;
M 为标准 Markers

图 5 MDH 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 5 SDS-PAGE profile of MDH from swine heart

2.6 测定葡萄酒中 L-苹果酸方法的建立

双酶法是比较经典的测定 L-苹果酸的方法,该方法所用化学试剂无毒性,配置简单,易于存放,测定方法简便,可以一次分析大量样品,且无污染环

境,参考国外有关文献,选用了酶法定量测定 L-苹果酸。该法为测定 L-苹果酸的特异性方法,D-苹果酸、D-乳酸、L-乳酸、L-天门冬氨酸、富马酸等均不干扰此反应。酶法除特异性良好外,还具有样品用量小、一般不需要复杂预处理、快速、简便、重复性良好等优点,既适合于单个样品的测定,又适合于批量样品分析。

样品中 L-苹果酸质量浓度的计算公式:

$$C = \frac{V \times M_w}{\epsilon \times d \times V \times 1000} \times \Delta A \quad \text{g/L} \quad (1)$$

式中: V 为反应体系总体积 mL; M_w 为 L-苹果酸摩尔质量 g/mol; V 为样品体积 mL; d 为光径 cm; ϵ 为 NADH 在 340 nm 下的吸光系数 $6.3(1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$ 。

在葡萄酒的发酵过程中,发酵液中的 L-苹果酸的含量要随时进行测定^[13],在生产中要监控发酵进程,采用这种方法测定葡萄酒中 L-苹果酸的含量,操作简便,耗时短,便于生产的监控。一种测定方法是否可行,可通过准确度和精密度来检验,准确度可用“回收率”衡量,精密度反映的是同一样品测定的一致性和稳定性^[14]。为了考查该测定方法的准确度和精密度,分别配置 0.052、0.107、0.153、0.201、0.253 mg/mL 的 L-苹果酸溶液,然后用上文建立的测定方法测定样品中 L-苹果酸的含量,结果见表 2。

表 2 标准溶液测定结果

Tab. 2 Determination of standard solution

样品溶液 质量浓度/ (mg/mL)	测定值/ (mg/mL)	平均值/ (mg/ mL)	变异 系数 CV/%	回收 率/ %
0.052	0.052 0.054 0.053	0.053	1.8	101.9
0.107	0.106 0.104 0.105	0.105	0.95	98.1
0.153	0.153 0.151 0.155	0.153	1.3	100.0
0.201	0.202 0.198 0.200	0.200	1.0	99.5
0.253	0.250 0.246 0.248	0.248	0.81	98.0

由表 2 可知,用上述方法分别测定 5 个已知浓度标准溶液中 L-苹果酸含量的回收率为 98.0%~101.9%,平均回收率为 99.5%,变异系数为 0.81%~1.8%,准确度和精密度都比较高。因此该方法用于测定标准溶液中 L-苹果酸的含量是可行的。

2.7 MDH 测定葡萄酒中 L-苹果酸的结果

葡萄酒的成分比较复杂,其中的色素和未知组分可能会干扰葡萄酒中 L-苹果酸的测定,为了进一步考查该方法的可行性,作者分别对 5 种不同葡萄酒样品进行 L-苹果酸的测定,同时做标准 L-苹果酸溶液的回收率实验,结果见表 3。

表3 酒样中L-苹果酸的测定结果
Tab.3 Determination of L-malic acid in wine

样品	测定结果/ (mg/mL)	加入标准品质量 浓度/(mg/mL)	加入标准品后的测定结果/ (mg/mL)			平均值/ (mg/mL)	变异系数 CV/%	回收率/ %
王朝1	2.027	0.201	2.214	2.223	2.217	2.218	0.21	95.0
王朝2	1.623	0.201	1.820	1.831	1.825	1.825	0.30	100.4
长城1	3.749	0.201	3.945	3.960	3.942	3.949	0.24	99.5
长城2	3.137	0.201	3.307	3.325	3.341	3.324	0.51	93.2
张裕1	0.682	0.201	0.875	0.886	0.890	0.884	0.87	100.3

由表3可以看出,用双酶法测定葡萄酒中L-苹果酸含量的回收率为93.2%~100.4%,平均回收率为97.68%,3次平行测定的变异系数为0.21%~0.87%。由此可以看出,用此方法测定葡萄酒中L-苹果酸含量的回收率比较好,适合葡萄酒中L-苹果酸含量的测定。

3 结 语

1) 采用组织破碎,二度硫酸铵盐析、DEAE Sepharose F. F. 离子交换层析、Phenyl Sepharose 6 F. F. 疏水层析及 Sephadex G-75 Fine 凝胶过滤等方法进行分离纯化,提取纯化的苹果酸脱氢酶比酶

活达1212.97 U/mg,纯化倍数达到122.64倍,酶活力回收率为53.64%。

2) Sephadex G-75 Fine 凝胶过滤和 SDS-PAGE 电泳结果显示制得的苹果酸脱氢酶相对分子质量约为69 000,含有2个亚基,每个亚基的相对分子质量约为34 000。

3) 利用苹果酸脱氢酶开发出一种测定葡萄酒中L-苹果酸的新方法。本法测定L-苹果酸含量的范围为0.005~0.3 g/L,反应温度为25℃,检测波长为340 nm,该方法操作简单易行,测定结果准确可靠;通过标准样品和葡萄酒样品精密度及回收率实验,证明该方法适合葡萄酒中L-苹果酸含量的测定。

参考文献(References):

- [1] Goward C R, Nicholls D J. Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution and catalysis [J]. *Prot Sci*, 1994(3): 1882-1888.
- [2] 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 research of malate dehydrogenase activity in various tissues on rabbit and mouse [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2005, 38(5): 44-47. (in Chinese)
- [3] 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): 86-90.
LIU Yan-he, XU Bao-hua. Genetic differences of malate dehydrogenase(MDH) II Genes in reciprocal combinations of six western honeybee subspecies [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science*, 2003, 21(2): 86-90. (in Chinese)
- [4] 张元亮, 王云山. 猪心线粒体苹果酸脱氢酶的制备[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 from pig heart [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 1994, 15(1): 24-27. (in Chinese)
- [5] 袁勤生. 现代酶学[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2001.
- [6] G. G. 吉尔伯特. 酶法分析手册[M]. 缪辉南译. 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: 39-47.
- [8] 诸葛建, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 686-688.
- [9] 王立艳, 汪建军, 杨海麟, 等. 猪心肌乳酸脱氢酶的提取工艺及酶反应最适条件[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2004, 27(2): 70-73.
WANG Li-yan, WANG Jian-jun, YANG Hai-lin, et al. Purification and optimal reaction conditions of lactate dehydrogenase (LDH) from porcine heart [J]. *Journal of Nanjing Normal University: Natural Science*, 2004, 27(2): 70-73. (in Chinese)
- [10] 程国华. 生物化学实验技术[M]. 沈阳: 沈阳农业大学出版社, 1998: 11-14.
- [11] 马国良, 邢志栋. 计算方法[M]. 西安: 西北大学出版社, 1992.
- [12] 李洪山. 旱生植物梭梭苹果酸脱氢酶的纯化及其性质的研究[J]. 新疆大学学报. 1994, 11(1): 72-76.
LI Hong-shan. Study on NAD-malate dehydrogenase from Haloxylon ammodendron [J]. *Journal of Xinjiang University*, 1994, 11(1): 72-76. (in Chinese)
- [13] 赵光鉴, 尹卓容, 张继民, 等. 葡萄酒酿造学—原理及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [14] 常碧影, 梁冬生, 阎惠文, 等. 氨基酸分析技术的研究与现状[J]. 氨基酸和生物资源, 1992(2): 29-40.
CHANG Bi-ying, LIANG Dong-sheng, YAN Hui-wen, et al. Study and current level of techniques in amino acid analysis [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 1992(2): 29-40. (in Chinese)

(责任编辑: 杨 萌)