

应用亲和层析制备萝卜叶溶菌酶

卢顺舵 徐凤彩 李明启

(华南农业大学农业生物系, 广州, 510642)

摘要 应用脱氨几丁质亲和层析直接从萝卜叶粗提液中制备溶菌酶, 所得精酶比活力为 42 162 U/mg 蛋白, 活力回收为 65%, 得率为 10.6 $\mu\text{g/g}$ 鲜叶, 纯化倍数为 77.4 倍。效果优于应用几丁质、CM-几丁质的纯化效果。

关键词 萝卜叶溶菌酶; 脱氨几丁质; 亲和层析

中图分类号 Q557.2

溶菌酶 (EC 3.2.1.17) 是一种糖苷键水解酶, 能水解 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间以及 N-乙酰葡萄糖胺之间的 $\beta-1,4$ 糖苷键 (船津胜等, 1982)。目前, 溶菌酶在食品防腐保鲜、生物工程技术中菌体细胞壁的裂解以及医学上的诊断和治疗等方面已得到广泛的应用 (缪辉南, 1985)。在以往溶菌酶的制备技术研究中, 盐析、凝胶过滤、离子交换层析及亲和层析等方法均已被采用。其中亲和层析法利用酶与其配基之间的专一亲和特性, 有效地精制了目的酶, 而且步骤简单。如用几丁质 (Cherkasov et al, 1967)、CM-几丁质 (Imoto et al, 1968)、CC-纤维素 (Imoto et al, 1973) 等物质作为亲和吸附剂, 有效地精制了微生物、动物和植物等不同来源的溶菌酶。张珍田等 (1986) 用脱氨几丁质为亲和吸附剂纯化鸡蛋清溶菌酶, 取得了较理想的效果。在诸多亲和吸附剂中, 几丁质或其衍生物应用得比较多, 纯化效果较好, 同时, 几丁质及其衍生物来源丰富, 易于制备, 再生简单, 因而具有应用于批量生产溶菌酶的巨大潜力。我们以脱氨几丁质为亲和吸附剂, 直接从萝卜叶的抽提液中精制溶菌酶, 纯化效果良好, 为萝卜叶溶菌酶或有关植物溶菌酶的开发应用研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 萝卜 (*Raphanus sativus*) 栽培于试验地中, 在自然条件下生长取成熟新鲜的叶片, 作酶制备原料。

1.1.2 化学试剂 蟹壳几丁质由中科院广州化学研究所提供, 溶壁微球菌冻干粉为 Sigma 公司产品。牛血清白蛋白为上海生化所产品。

1.2 方法

1.2.1 蟹壳几丁质、脱乙酰几丁质和脱氨几丁质的制备 参照张珍田等 (1986) 的方法。

1.2.2 粗酶的制备 参照 Chandan 和 Ereifej (1981) 的方法, 取成熟新鲜的萝卜叶剪碎, 加入 1~1.5 倍于材料的 0.066 mol/L, pH6.2 的冷 (4℃) 磷酸钠缓冲液, 捣碎机匀浆, 尼龙布 (140 目)

1995-01-12 收稿

过滤。滤液于室温下用 4000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 即为粗酶液。

1.2.3 几丁质、脱乙酰几丁质和脱氨几丁质对萝卜叶溶菌酶吸附性能的测定 取制备好的 3 种亲和吸附剂各 5 g, 加少许水膨润。分别加入粗酶液 25 mL, 于室温下缓慢搅拌, 每隔 14 min 停止搅拌 1 min, 待吸附剂沉淀后, 取上清液, 测定残留酶液的活性, 至 75 min 吸附饱和为止。

1.2.4 蟹壳脱氨几丁质对酶定量吸附的测定 取 20 g 蟹壳脱氨几丁质, 加入粗酶液 210 mL (1.15 mg 蛋白/mL, 832 U/mL), 并于 4℃ 下缓慢搅拌 2 h, 待吸附剂沉淀后, 取上清液测定残留溶菌酶的活性及蛋白质的含量。

1.2.5 萝卜溶菌酶的亲和层析 取蟹壳脱氨几丁质 25 g, 用 0.066 mol/L 磷酸钠缓冲液充分平衡, 吸干, 加入 210 mL 粗酶液于 4℃ 下缓慢搅拌 2 h。装柱 (3.5 cm×8.0 cm), 层析柱先用蒸馏水洗涤至在 280 nm 波长下无光吸收, 酶用 0.1 mol/L HAc 洗脱 (100 mL/h), 分部收集 (5 mL/管) 酶活性部分, 然后将其对缓冲液透析即为精酶液。

1.2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳 经亲和层析所得的精酶液用 2.5% 的浓缩胶, 7.5% 的分离胶进行电泳 (加样量为 50 μ L/管, 电流为 4 mA/管), 电泳完毕凝胶用 0.1% 的考马斯亮蓝 R-250 染色, 以 7.5% 的冰乙酸脱色, 观察蛋白带。

1.2.7 酶活力测定 参照 Shugar (1952) 的方法, 以溶壁微球菌为底物, 加 0.066 mol/L, pH 6.2 的磷酸钠缓冲液, 研磨配成悬浊液 (A_{450} 为 0.7 左右)。在 30℃ 下吸取 2.5 mL 底物悬浊液, 加入 0.1 mL 酶液, 迅速混匀, 于 450 nm 波长下测定光密度下降值, 在反应成线性的范围内计算酶活性。在上述条件下, 以每分钟下降 0.001 个光密度值的酶量为一个活性单位 (U)。

1.2.8 蛋白质含量的测定 按 Bradford (1976) 的方法, 并以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2 结果讨论

2.1 蟹壳几丁质、脱乙酰几丁质和脱氨几丁质对萝卜叶溶菌酶的吸附性能

在酶液中加入各种亲和吸附剂并缓慢搅拌, 则溶菌酶被吸附到吸附剂上, 而使上层液的溶菌酶活性下降。3 种吸附剂对溶菌酶的吸附百分率与搅拌时间的关系如图 1 所示, 结果表明, 3 种吸附剂均在与酶混合搅拌 75 min 后即达饱和, 且脱氨几丁质的吸附效率稍高。脱氨几丁质是天然几丁质的衍生物, 其作用类似于溶菌酶的抑制因子, 能与酶结合 (Weaver et al, 1977)。由于脱氨几丁质已除去天然几丁质对杂蛋白的非专一性吸附基团, 因而增强其对溶菌酶的吸附特异性。

2.2 脱氨几丁质对酶的吸附容量

用静态吸附法测定脱氨几丁质对酶的吸附容量活性吸附量为 7 917 U/g 脱氨几丁质, 蛋白吸附容量为 4.1 mg 蛋白/g 脱氨几丁质 (表 1)。

2.3 萝卜叶溶菌酶的亲和层析

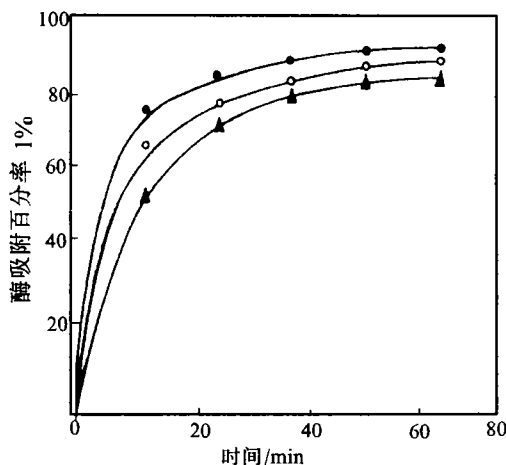


图 1 不同亲和吸附剂对萝卜叶溶菌酶的吸附百分率与搅拌时间的关系

○—○: 蟹壳脱氨几丁质; ●—●: 蟹壳脱乙酰几丁质; ▲—▲: 蟹壳几丁质。



参 考 文 献

- 张珍田,任瑞芝,宗贤一,等.1986.用亲和层析法纯化鸡蛋白溶菌酶之研究.中国农业化学汇集(台湾), 24(3):272~279
- 船津胜,鹤大典.1982.溶菌酶.李兴福,荆永志译校.1982.济南:山东科学技术出版社,1~20
- 缪辉南.1985.溶菌酶的生化特性、制备及其在医学上的应用.生化药物杂志, (3):28~41
- Bradford M A. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem,72:248~254
- Chandan R C, Ereifej K I. 1981. Determination of lysozyme in raw fruits and vegetables. J Food Sci, 46:1278~1279
- Cherkasov I A, Kravchenko N A, Kaverneza E D. 1967. Isolation and purification of lysozyme by fractionation on a chitin-containing column. Mol Biol, 1(1):41~46
- Imoto T, Hayashi T, Funatsu M, 1968. Characterization of enzyme-like complex of lysozyme. J Biochem, 64(3):387~392
- Imoto T, Yagishita K. 1973. Chitin coated cellulose as an adsorbent of lysozyme-like enzyme: preparation and properties. Agr Biol Chem, 37(3): 465~470
- Shugar D. 1952. Determination of lysozyme. Biochem. Biophys Acta, 8:302
- Weaver G L, Knoger M, Katz F. 1977. Determination chitin affinity chromatography a method for the isolation, purification and concentration of lysozyme. J Food Sci, 42(4):1084~1087

PURIFICATION OF A LYSOZYME FROM *Raphanus sativus* LEAVES BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Lu Shunduo Xu Fengcai Li Mingqi

(Dept. of Agr. Biology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

A lysozyme from *Raphanus sativus* leaves was purified by affinity chromatography on a crab deaminated chitin column. The specific activity of the purified lysozyme was increased by 77.4 folds and reached 42162 U/mg protein, the recovery of total activity was 65%, and the yield of the purified lysozyme from the leaves was 10.6 $\mu\text{g/g}$ fresh weight.

Key words lysozyme from *Raphanus sativus* leaves; crab deaminated chitin; affinity chromatography