

文章编号:1673-1689(2005)06-0038-05

高纯度诊断用乳酸脱氢酶的制备和酶促反应

石轩峰, 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 214036)

摘 要: 设计并优化了植物乳杆菌发酵制备高纯度诊断用乳酸脱氢酶的技术路线。从培育的厌氧型植物乳杆菌中粗提乳酸脱氢酶制备液, 经过 DEAE Sepharose F. F. 离子交换层析、Phenyl Sepharose 6 F. F. 疏水层析及 Sephadex G-25 Fine 凝胶过滤等方法进行分离纯化, 比酶活达 1 096.8 U/mg, 纯度达 88%, 纯化倍数达到 21.4 倍, 酶活力回收率为 53.9%; 高效液相色谱和 SDS-PAGE 电泳结果显示制得乳酸脱氢酶相对分子质量约为 80 000, 含有两个亚基, 每个亚基分子量约为 39 000。

关键词: 乳酸脱氢酶; 植物乳杆菌; 纯化; 酶促反应

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Preparation and Enzyme Catalytic Reaction Conditions of Diagnostic Lactate Dehydrogenase with High Purity

SHI Xuan-feng, YANG Hai-Lin, WANG Wu*

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

Abstract: The preparation of diagnostic Lactate Dehydrogenase with high purity from a strain of *Lactobacillus plantarum* was designed. LDH was prepared by DEAE Sepharose F. F. ion exchange chromatography, Phenyl Sepharose 6 F. F. hydrophobic chromatography, and Sephadex G-25 Fine. The final specific activity of LDH was up to 1096.8 U/mg and the purity was 88%. 21.4-fold purification was obtained with enzymatic activity recovery of 53.9%. The molecular weight of LDH measured by HPLC was 80 000, and the molecular weight of each subunit shown on SDS-PAGE was 39 000. The enzyme catalytic reaction conditions of LDH was also studied.

Key words: Lactate Dehydrogenase; *Lactobacillus plantarum*; purification; enzyme catalytic reaction

乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH, EC 1.1.1.27)又称 NAD 氧化酶, 可用于丙酮酸盐的检定、白血病和心肌梗塞的诊断等, 是一种常用的生化试剂和临床医用诊断用酶^[1], 目前中国需依

赖进口。LDH 广泛存在于动物、植物和微生物中^[4]。虽然对其进行研究的报道很多, 但商品化的 LDH 主要来源于动物组织。动物组织酶系复杂, 组分随原料来源的不同而变化, 提取工艺复杂, 产品

收稿日期: 2004-10-11; 修回日期: 2005-02-04.

基金项目: 国家“十五”攻关项目(2001BA501A16)资助课题.

作者简介: 石轩峰(1980-), 男, 河南洛阳人, 发酵工程硕士研究生。* 责任作者.

成本高,而细菌中酶系稳定,易于大规模培养。因此,发酵法生产 LDH 有较大的理论研究和实际应用价值。

作者所在实验室分离、改良了一株乳酸脱氢酶产生菌——植物乳杆菌 RS2-2。该菌属于厌氧菌,发酵单位低。针对本菌种的生理生化特点,对其培养基和发酵条件进行优化,菌体量有了较大幅度的提高,可满足工业化生产要求。进一步的研究发现其产生的 LDH 没有同工酶,也不需要 1,6-二磷酸果糖激活^[6],其相对分子质量、亚基数量及酶学性质等方面和目前已报道的不尽相同^[2],初步认定是一种新的乳酸脱氢酶,可应用于生化和诊断测试 L-丙酮酸。根据植物乳杆菌 RS2-2 酶系组成特点,设计了适合于工业化生产的提取制备技术路线。该工艺生产 LDH 具有操作简单,酶活力回收率高等优点,为细菌发酵生产乳酸脱氢酶和对该酶的进一步研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 植物乳杆菌 RS2-2,作者所在实验室从泡菜汁中筛选并保存。

1.1.2 培养基 种子培养基(g/L):酵母膏 5,蛋白胨 10,葡萄糖 5;发酵培养基(g/L):麦芽糖 15,酵母膏 15, K_2HPO_4 4,乙酸铵 3。

1.1.3 主要试剂及仪器 NADH:上海生工,Amresco 进口分装产品;丙酮酸钠:上海曹扬第二试剂厂产品;牛血清蛋白:上海丽珠东风生物技术有限公司生产;CR22G 高速冷冻离心机,754UV 紫外可见分光光度计,上海分析仪器总厂生产;250W 自制超声破碎仪:无锡超声设备有限公司加工生产。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌的培养及细胞粗酶液的制备 斜面菌株接到种子培养基中培养 12~14 h,按体积分数 10%接种量接种到发酵培养基中,30℃静置培养 22~24 h;离心发酵液收集菌体,菌体用缓冲液悬浮,超声波破碎,得粗酶液。粗酶液用饱和度为 40%的硫酸铵盐析沉淀,再透析和浓缩。

1.2.2 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的制备方法

1) DEAE Sepharose F.F. 阴离子交换层析(2.6 cm×30 cm):体积流量 5 mL/min,磷酸钾缓冲液平衡层析柱,分别用磷酸钾缓冲液(0.2 mol/L NaCl)和磷酸钾缓冲液(0.3 mol/L NaCl)分段洗脱,收集活性吸收峰。

2) Phenyl Sepharose 6 F.F. 疏水层析(1.6

cm×30 cm):体积流量 3 mL/min,平衡液为磷酸钾缓冲液(0.5 mol/L $(NH_4)_2SO_4$),乳酸脱氢酶不吸附,直接流出,收集活性吸收峰。

1.2.3 高纯度诊断用乳酸脱氢酶相对分子质量和纯度的测定

1) 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的高效液相色谱分析

最后所得的成品酶液进行高效液相色谱法层析。柱型号:Shodex PROTEIN KW-803;流动相:0.05 mol/L 磷酸钾+0.3 mol/L NaCl 缓冲液(pH 7.0);体积流量:1.0 mL/min;柱温:25℃。

2) 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的 SDS-PAGE 电泳分析

最后所得的成品酶液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.4 酶活力测定 LDH 在催化丙酮酸转化为乳酸的同时,将 NADH 氧化成 NAD,使得 NADH 在 340 nm 处的吸光度不断降低,因此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。酶活单位定义为:25℃时,每分钟氧化 1 μ mol NADH 所需的酶量。

测定混合液为:0.03 mol/L 丙酮酸钠溶液 0.1 mL,0.006 mol/L NADH 0.1 mL,0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.5)2.8 mL 和 0.1 mL 酶液,于 25℃监测反应体系在 340 nm 的吸光度变化,根据每分钟吸光度的降低值即可计算出酶活。

1.2.5 蛋白质质量测定方法 用 Bradford^[3]法测定蛋白质质量,以牛血清蛋白为标准样品。

2 结果与讨论

2.1 高纯度诊断用乳酸脱氢酶制备工艺的确定

2.1.1 离子交换层析对收集 LDH 的影响 离子交换层析是一种常用的蛋白质分离工具,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。乳酸脱氢酶的等电点大约在 5.0 左右,因此可用 DEAE 阴离子交换剂进行分离纯化。对层析条件的研究表明:用磷酸钾缓冲液(0.2 mol/L NaCl)和磷酸钾缓冲液(0.3 mol/L NaCl)分段洗脱,DEAE 离子交换柱的分离效果最佳,LDH 集中在磷酸钾缓冲液—0.3 mol/L NaCl 的洗脱峰中。经过 DEAE 离子交换层析柱之后,乳酸脱氢酶的比酶活比先期经盐析沉淀的粗酶液提高了 10 倍,酶活回收率达到 85%(相对上样前),分离纯化效果十分显著。结果见图 1。

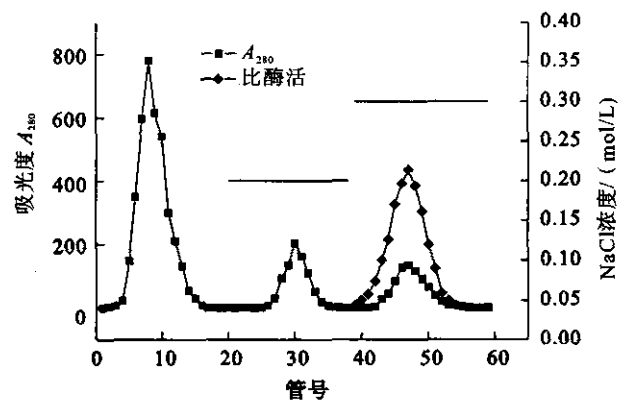


图 1 DEAE 离子交换层析图

Fig. 1 DEAE Sepharose chromatography

2.1.2 疏水层析对 LDH 的进一步纯化 经过 DEAE 离子交换层析柱之后,乳酸脱氢酶的比活有了很大幅度的提高,但仍达不到市场要求,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工具,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度的不同而进行分离的技术.据报道^[5],乳酸脱氢酶疏水力很强,因此,可以采用疏水层析进一步分离纯化乳酸脱氢酶.对疏水层析过程中体系盐浓度的研究发现:当体系中盐浓度为 1.0 mol/L (NH₄)₂SO₄和 0.8 mol/L (NH₄)₂SO₄时,乳酸脱氢酶与疏水介质结合紧密,需用 0.3 mol/L (NH₄)₂SO₄才能洗脱下来,操作时间长,效率低,而且酶活收率只有 30%(相对上样前);当体系中盐浓度为 0.5 mol/L (NH₄)₂SO₄时,乳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,乳酸脱氢酶的收率达到了 90%(相对上样前),比酶活比粗酶液提高了 57 倍.结果如图 2 所示.

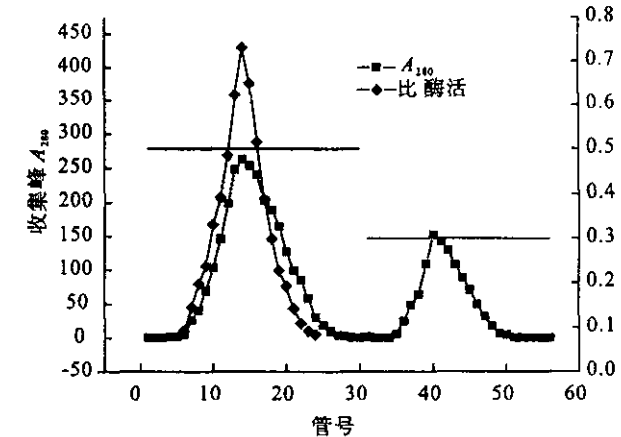


图 2 疏水层析图

Fig. 2 Phenyl Sepharose chromatography

2.1.3 SephadexG25 凝胶过滤对 LDH 的脱盐作用 经过 DEAE 离子交换层析和疏水层析之后的乳酸脱氢酶,其比活已基本达到要求,但由于体系

中盐含量高,因此,需对 DEAE 离子交换层析和疏水层析之后的样品进行脱盐处理.用 SephadexG25 凝胶过滤进行脱盐的结果见如图 3,实验发现经过 SephadexG25 凝胶过滤除盐之后,酶液的电导率已低于 125 μs/cm,已基本除去不必要的盐份,并且在脱盐的同时除去了部分杂蛋白.

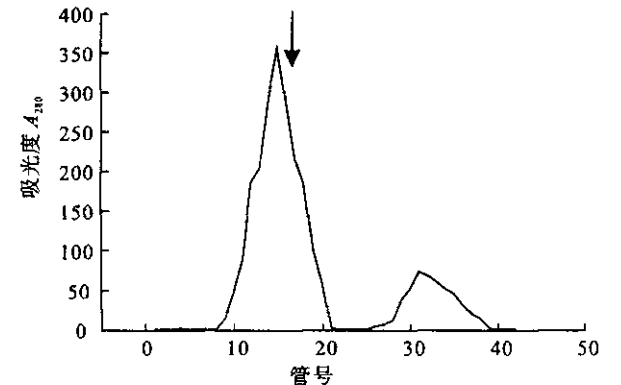


图 3 SephadexG25 凝胶过滤层析图

Fig. 3 SephadexG25 chromatography

2.1.4 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的制备结果分析 高纯度诊断用乳酸脱氢酶制备的各步操作对纯化效果的影响见表 1.从表 1 可以发现硫酸铵沉淀时酶活损失大,这是由于乳酸脱氢酶被沉淀物吸附所致;G25 凝胶过滤层析时,虽然除去了部分杂蛋白,但比活并没有提高,这可能是部分乳酸脱氢酶被吸附或者是被除去盐分中的某些成分(如某些金属离子)对酶有一定的保护作用,在以后的工业化生产中建议采用膜分离技术脱盐.

表 1 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的制备结果

Tab. 1 Purification of LDH with high purity

纯化步骤	总酶活/ U	总蛋白/ mg	比活力/ U/mg	总回收 率/%	纯化 倍数
粗酶液	12096	236.25	51.2		
40%硫酸铵沉淀	8910	113.72	78.35	73.7	1.53
离子交换层析	7526.4	13.8	545.39	62.2	10.65
疏水层析	6905	6.24	1106.6	57.08	21.61
G25 凝胶过滤	6514.9	5.94	1096.8	53.9	21.4

从表 1 数据可知:经过硫酸铵沉淀、离子交换层析、疏水层析及 G25 凝胶过滤层析之后,高纯度诊断用乳酸脱氢酶的比活力已达到市场要求水平(市场水平为 800 ~1 200 U/mg),且酶活总回收率和纯化倍数都很高,为高纯度诊断用乳酸脱氢酶的工业生产提供了一定基础.

2.2 高纯度诊断用乳酸脱氢酶相对分子质量和纯度的测定

2.2.1 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的高效液相色谱

采用 SDS-PAGE 电泳和高效液相色谱对成品酶进行相对分子质量和纯度的测定. 高效液相色谱结果如图 4 所示.

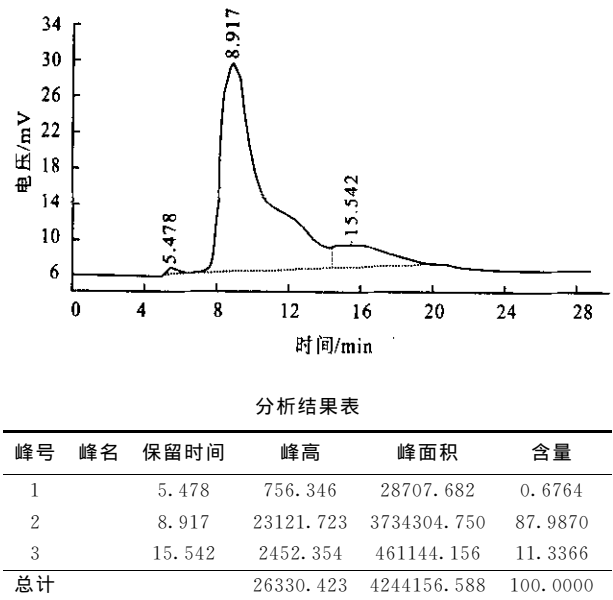


图 4 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的高效液相色谱层析

Fig. 4 Gel liquid chromatography of LDH with high purity

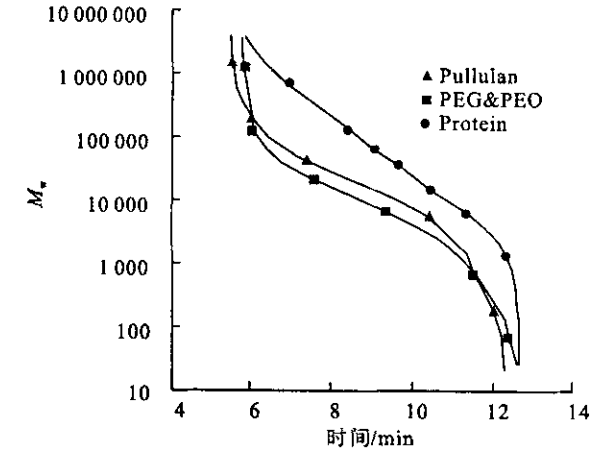


图 5 液相色谱仪 KW-803 柱测蛋白质相对分子质量的标准曲线

Fig. 5 Calibration curves for the KW-803 column

图 4 结果显示经过纯化之后,乳酸脱氢酶的纯度达到了 88%. 根据图 5 色谱仪 KW-803 柱测蛋白质分子量的标准曲线分析可知:本实验室自筛菌株—植物乳杆菌所生产的高纯度诊断用乳酸脱氢酶的相对分子质量约为 80 000.

2.2.2 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳结果见图 6.

从图 6 分析可知:纯化后的高纯度诊断用乳酸脱氢酶蛋白已基本达到电泳纯要求. 另外,根据标准蛋白质分子量与相对迁移率的关系,可知乳酸脱氢酶的亚分子量约为 39 000,与高效液相色谱所测得分子量 80 000 不同,但两个值大约是两倍的关

系,因此,可以初步推断本实验室自筛菌株—植物乳杆菌所生产的高纯度诊断用乳酸脱氢酶含有两个亚基,且每个亚基的分子量约为 39 000 左右.

据文献报道^[2],嗜热脂肪芽孢杆菌所生产的乳酸脱氢酶分子量为 135 000,有 4 个亚基,亚基相对分子质量为 34 000,与植物乳杆菌所生产的乳酸脱氢酶有很大不同.

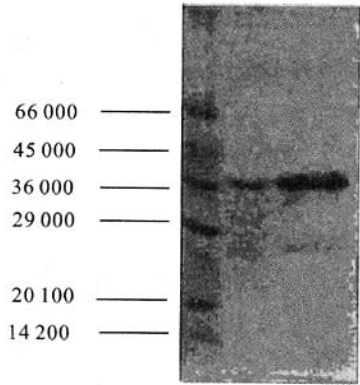


图 6 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 6 SDS-PAGE of LDH with higher purity

2.3 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的酶促反应条件初步研究

2.3.1 乳酸脱氢酶的最适反应温度及其热稳定性

将酶活测定混合液(酶液除外)在不同温度下保温 5 min,再加入酶液,并立即测定酶活力. 结果如图 7 所示. 从图 7 分析可知:酶反应最适温度在 45 ℃左右,50 ℃后,酶活力下降较快,到 67 ℃时酶基本已失活.

将酶液置于不同的温度下保温 10 min,25 ℃测定酶活力. 得到保温后的相对活力,如图 8 所示. 从图 8 分析可知:酶在 40 ℃之内保温 10 min 之后仍能保持 95% 以上的活力,有较好的热稳定性. 45 ℃保温 10 min 还剩 90% 左右的活力,当温度高于 45 ℃时,酶失活较快. 55 ℃下保温 10 min,基本检测不到酶活力.

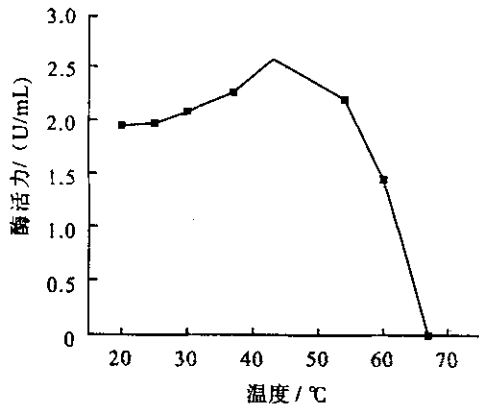


图 7 温度对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of temperature on LDH activity

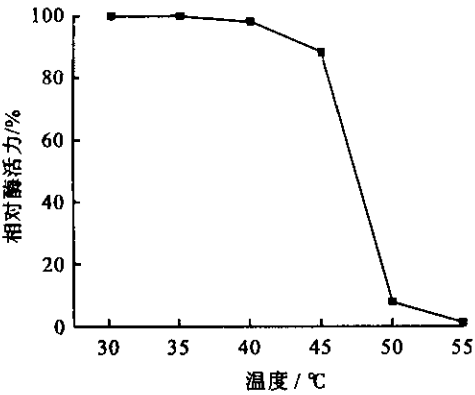


图 8 LDH 的热稳定性

Fig. 8 Thermal stabilization of LDH

2.3.2 乳酸脱氢酶的最适 pH 值及其 pH 稳定性

将酶活测定所用的缓冲液的 pH 值调至不同的值,然后在 25 °C 下测定酶活力.结果如图 9 所示.

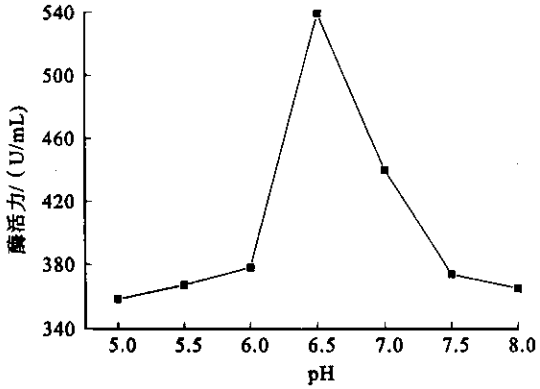


图 9 pH 对酶活力的影响

Fig. 9 Effect of pH on LDH activity

由图 9 分析可知:乳酸脱氢酶的最适 pH 值为 6.5.将酶液用不同 pH 值的缓冲液稀释 10 倍,于 30 °C 保温 2 h 后,于 25 °C 下测定在保温之后的酶活力.并以 pH 为 6.5,且未经保温的酶液中的酶活力为 100%,求得保温后的相对酶活力.结果如图 10 所示.由图 10 分析可知:经过不同 pH 条件处理后,酶在偏酸的条件下(pH 5.0 到 7.0 之间)能够保持

80%以上的活力;在偏中性的条件下(pH 6.8 到 pH 7.6 之间),能够保持 95%左右的活力,有较好的稳定性.

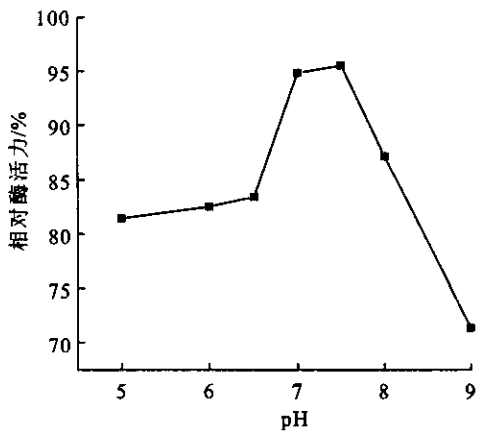


图 10 LDH 的 pH 稳定性

Fig. 10 pH stabilization of LDH

3 结 论

1) 采用本实验室自筛菌株—植物乳杆菌发酵制得了高纯度诊断用乳酸脱氢酶,最高的终比活达到 1 096.8 U/mg,纯化倍数 21.4,回收率 53.9%,纯度达 88%.

2) 经高效液相色谱和 SDS-PAGE 电泳分析:所生产的高纯度诊断用乳酸脱氢酶相对分子质量约为 80 000,含有 2 个亚基,且每个亚基的相对分子质量约为 39 000 左右,与已报道的细菌来源乳酸脱氢酶有很大区别,是一个新酶种.

高纯度诊断用乳酸脱氢酶最适 pH 值和温度分别为 6.5 和 45 °C,当其 pH 值在中性偏酸条件下时,保温 2 h 之后仍能够保持 95%左右的活力,有较好的稳定性.其性质与已报道的乳酸脱氢酶的性质有很大区别.

参考文献:

[1] Al-Jassabi S. Purification and Kinetic Properties of Skeletal Muscle Lactate Dehydrogenase from the Lizard *Agama stellio stellio*[J]. **Biochemistry** (Moscow), 2002, 67(7): 786—789.

[2] 何忠效, 静国忠. 现代生物技术概论[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1999, 212.

[3] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000, 39—47.

[4] 郑国爱. 细菌乳酸脱氢酶的纯化及其性质研究[J]. **生物技术**, 1999, 9: 11—15.

[5] Per-Erikn G, Anders A. Superporous agrose beads as a hydrophobic interaction chromatography support[J]. **J Chromatogr A**, 1999, 830: 275—284.

[6] Taguchi H, Yamashita M, Matsuzawa H, *et al.* Heat-Stable and Fructose-1,6-diphosphate-Activated L-Lactate Dehydrogenase from an Extremely Thermophilic Bacterium[J]. **J Biochem**, 1982, 91(4): 1343—1348.