

一种 ϵ -聚赖氨酸降解酶活性测定的新方法*

赵颖, 贾士儒, 谭之磊, 袁国栋

(天津科技大学, 天津市工业微生物重点实验室, 天津, 300457)

摘要 针对现有 ϵ -聚赖氨酸降解酶活力测定中存在的问题, 建立了一种利用甲基橙法测定 ϵ -聚赖氨酸量的变化, 从而测定 ϵ -聚赖氨酸降解酶酶活的新方法。通过对反应温度、时间、底物浓度和缓冲体系的研究, 确定了新方法的酶活测定条件。验证实验表明, 新方法有较好的精确性和准确性, 为 ϵ -聚赖氨酸降解酶的研究提供了一种安全简便的测定方法。

关键词 ϵ -聚赖氨酸降解酶, 酶活, 甲基橙法

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)是单个赖氨酸分子由 α -羟基和 ϵ -氨基形成酰胺键而连接成的一种聚合肽, 由属链霉菌科的菌产生^[1]。由于 ϵ -聚赖氨酸具有使用安全、广谱抑菌和可生物降解的特性^[2], 在日本、韩国和美国等国家被用做食品防腐剂。

有报道推测, 白色链霉菌的 ϵ -聚赖氨酸降解酶可能对细胞的自我保护具有重要作用^[3], 因而 ϵ -聚赖氨酸降解酶的存在对利用白色链霉菌合成 ϵ -聚赖氨酸是非常重要的。对 ϵ -聚赖氨酸降解酶进行特性和遗传分析有助于阐明 ϵ -聚赖氨酸的合成机制。另外, ϵ -聚赖氨酸降解酶可以制备不同聚合度的 ϵ -聚赖氨酸以满足不同用途的要求。因此进行 ϵ -聚赖氨酸降解酶的研究具有重要意义。

目前, 有关 ϵ -聚赖氨酸降解酶的报道还很少, 仅有 Mitsuki Kito 等^[3]作过 ϵ -聚赖氨酸降解酶提取及酶学性质初步研究的报道。其酶活测定用 *L*-赖氨酰-*p*-硝基酰苯胺作为反应底物, 由于反应生成的对硝基苯胺属高毒物质, 是一种强烈的高铁血红蛋白形成剂, 毒性比苯胺大, 吸入、口服和皮肤接触有害^[4]。因此, 本文建立了一种通过甲基橙法测定 ϵ -聚赖氨酸含量变化而测定 ϵ -聚赖氨酸降解酶酶活的安全简便方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

白色链霉菌 (*Streptomyces albulus*) TUST² 天

第一作者: 硕士研究生(贾士儒教授为通讯作者)。

* 国家 863 项目(2006AA102347); 国家“十五”科技攻关项目(2004BA713B05-061); 天津科技大学科研基金资助项目(20060207)

收稿日期: 2007-09-17, 改回日期: 2007-12-18

津科技大学, 天津工业微生物重点实验室筛选保藏。

1.1.2 培养基

M3G 培养基: 葡萄糖 5.0%, 酵母粉 0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0%, KH_2PO_4 0.136%, K_2HPO_4 0.08%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004%, pH 6.8, 121℃灭菌 20 min。

1.1.3 粗酶液

参考文献[3]制备。

1.1.4 主要试剂

ϵ -聚赖氨酸(银象公司提供, 分子质量 5 000 u), 对硝基苯胺(国药集团化学试剂有限公司, AR), *L*-赖氨酰对硝基苯胺(Sigma 公司, AR)。

1.2 方法

1.2.1 测定 ϵ -聚赖氨酸含量的工作曲线的绘制

采用修改后的 Itzhaki 的比色方法^[5], 将 2 mL 被测液(ϵ -PL: 0~200 μg)与 2 mL 1 mmol/L 甲基橙溶液混合, 所得混合物置于 30℃ 180 r/min 摇床中反应 30 min, 然后 4000 r/min 离心 15 min, 除去产生的 ϵ -聚赖氨酸甲基橙复合物。取上清液 1 mL 用磷酸缓冲溶液稀释至 50 mL, 465 nm 测吸光值, 以吸光度为横坐标, ϵ -聚赖氨酸含量为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.2 反应温度的确定

用含有 100 mmol/L Na_3PO_4 (pH 7.0)、0.5 mg/mL ϵ -聚赖氨酸和酶溶液的混合物测定不同温度(10~60℃)下 ϵ -聚赖氨酸的降解情况, 确定酶活测定温度。

1.2.3 反应时间的确定

用含有 100 mmol/L Na_3PO_4 (pH 7.0)、0.5 mg/mL ϵ -聚赖氨酸和酶溶液的混合物在 30℃ 下反应不同时间测定 ϵ -聚赖氨酸降解情况, 根据反应速率的变

化确定反应时间。

1.2.4 底物浓度的确定

用含有 100 mmol/L Na_3PO_4 (pH 7.0)、不同浓度 (0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL) ϵ -聚赖氨酸和酶溶液的混合物在 30℃ 反应 1 h, 分别测定 ϵ -聚赖氨酸降解速率, 以浓度的倒数 ($1/[S]$) 为横坐标, 以反应速度 ($1/[V]$) 的倒数为纵坐标作图, 计算得 K_m 值, 确定底物浓度。

1.2.5 最适缓冲盐溶液及 pH 值的确定

选择不同 pH 值的 100 mmol/L 的下列溶液作为缓冲体系: 柠檬酸/磷酸二氢钠 (pH 4.0~7.0)、 Na_3PO_4 (pH 6.0~8.0) 及 Tris/HCl (pH 7.0~9.0), 并含酶溶液和 0.5 mg/mL ϵ -聚赖氨酸的混合物 30℃ 下反应 1 h, 分别测定 ϵ -聚赖氨酸降解曲线, 确定最适缓冲盐溶液及 pH 值。

1.2.6 对硝基苯胺浓度标准曲线的绘制

用 pH 7.0 的 100 mmol/L K_3PO_4 缓冲液配制不同浓度 (0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 $\mu\text{mol/mL}$) 对硝基苯胺溶液, 410 nm 测吸光度值, 以吸光度为横坐标, 对硝基苯浓度为纵坐标绘制标准曲线。

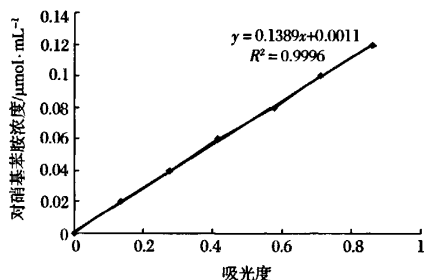


图1 对硝基苯胺浓度标准曲线

2 结果与讨论

2.1 测定 ϵ -聚赖氨酸含量的工作曲线:

绘制的 ϵ -聚赖氨酸标准曲线如图 2。线形回归得到下式: $y = -0.5959x + 0.1523$, $R^2 = 0.9992$, 其中 x 为 OD_{465} , y 为相应 ϵ -聚赖氨酸浓度。

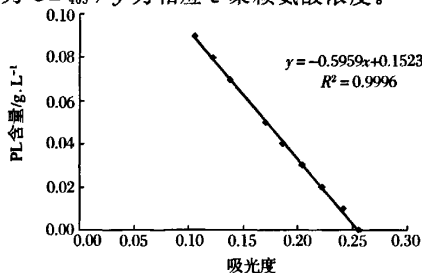


图2 ϵ -PL 含量测定标准曲线

2.2 酶活测定条件的确定

2.2.1 反应温度的确定

不同温度下反应 1 h, 结果如图 3, 可以看出 ϵ -聚赖氨酸降解酶的最适反应温度为 30℃。

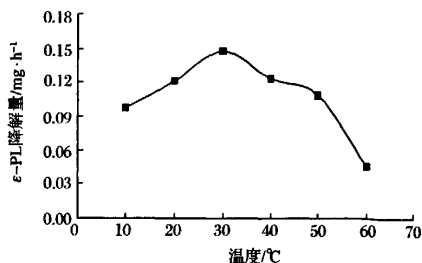


图3 温度对酶活的影响

2.2.2 反应时间的确定

用含有 100 mmol/L Na_3PO_4 (pH 7.0)、0.5 mg/mL ϵ -聚赖氨酸和酶溶液的混合物在 30℃ 下反应不同时间测定 ϵ -聚赖氨酸降解情况, 结果如图 4。从图 4 中可以看出, ϵ -聚赖氨酸降解速率在 2 h 内维持不变。2 h 后反应速率开始下降。确定反应时间为 60 min, 这样可以保证所测得的反应速度为酶促反应初速度。

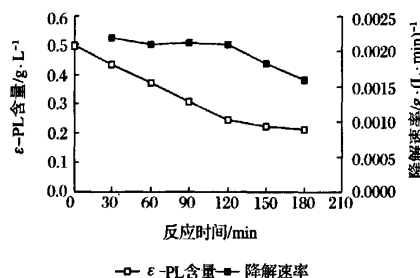


图4 酶活测定中反应时间的确定

2.2.3 底物 ϵ -聚赖氨酸浓度的确定

由于比色法测定 ϵ -聚赖氨酸含量时用的缓冲液是磷酸缓冲液, 先用含有 ϵ -聚赖氨酸的磷酸缓冲液作为缓冲体系测定不同 ϵ -聚赖氨酸初浓度 (0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL) 下的粗酶液中 ϵ -聚赖氨酸降解情况。根据 Lineweaver-Burk 作图法作图, 结果如图 5。

根据底物 ϵ -聚赖氨酸浓度和降解反应速率之间的关系采用双倒数法求得米氏常数 K_m , 计算得 K_m 为 0.227 mg/mL。因当底物浓度远大于 K_m 值时, 反应速率已达最大速率, 这时酶全部被底物饱和, 反应速率与底物浓度无关, 符合零级动力学, 在此条件下才能正确测得酶活力, 因此确定底物浓度为 0.5 mg/mL。

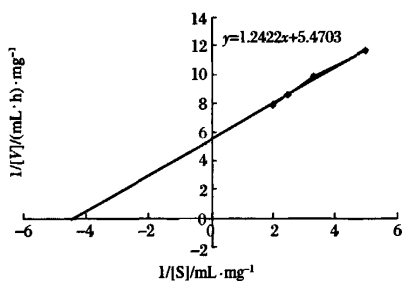
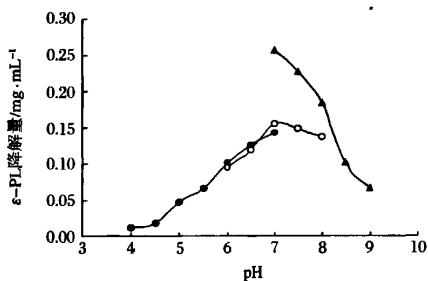


图5 米氏方程 Lineweaver-Burk 图

2.2.4 最适缓冲盐溶液及 pH 值的确定

酶促反应体系的 pH 和缓冲溶液本身的性质, 对于酶活测定过程影响很大。实验测定了不同 pH 值的柠檬酸/ NaH_2PO_4 、 Na_3PO_4 及 Tris/HCl 缓冲液对 ϵ -聚赖氨酸降解酶活力的影响, 如图 6。可以看出 3 种缓冲液中都是 pH 7.0 时降解活性最大。由于比色法测定 ϵ -聚赖氨酸含量时用的缓冲液是磷酸缓冲液, 因此将其 NaH_2PO_4 作为测定酶活的缓冲体系。



○磷酸钠, ●柠檬酸/磷酸二氢钠, ▲Tris/HCl

图6 缓冲盐溶液 pH 对酶活的影响

2.2.5 精确性

综合以上结果, 酶活的定义为 30°C 下 1 h 催化降解 0.1 mg ϵ -聚赖氨酸作为 1 个活力单位。反应在 30°C 进行 1 h, 反应混合物含有 5 mg ϵ -聚赖氨酸、1 mmol Na_3PO_4 (pH 7.0) 和酶溶液, 终体积为 10 mL, 添加 1 mL 2 mol/L HCl 终止反应, 用比色法测定 ϵ -聚赖氨酸浓度。

为了验证新建酶活测定方法的精确性, 对同样的酶溶液重复测定 5 次。从表 1 可以看出, 新建立的酶活测定方法精确性好。

表1 酶活测定的精确性

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 酶活力/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 1.073 | 1.043 | 1.102 | 1.102 | 1.132 |

注: 酶活平均值为 1.090, 相对偏差为 2.42%。

2.3 验证实验

对不同浓度的 ϵ -聚赖氨酸降解酶酶溶液分别用

文献[3]中方法和新建方法进行活性测定, 结果如图 7 所示。从图 7 中可以看出, 新建酶活测定方法与文献中方法具有较好的相关性 ($R^2 = 0.99$), 因而新建酶活测定方法具有较好的准确性, 可以准确测定 ϵ -聚赖氨酸降解酶的酶活力。

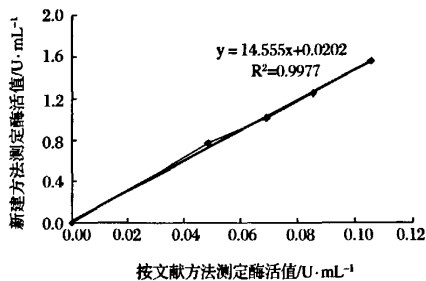


图7 两种酶活测定方法的相关性

3 结论

以 ϵ -聚赖氨酸为底物, 通过甲基橙法测定 ϵ -聚赖氨酸量的变化从而测定 ϵ -聚赖氨酸降解酶的酶活, 与文献中方法相比, 新建方法所用药品易得且无任何有毒物质。同时, 通过实验验证, 新建方法有较好的准确性和精确性, 这为 ϵ -聚赖氨酸降解酶的研究提供一种安全简便的测定方法。

参考文献

- 1 Nishikawa M, Ogawa K. Distribution of microbes producing antimicrobial ϵ -poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(7): 3 575~3 581
- 2 Hiraki J, Hatakeyama M, Morita H, et al. Improved ϵ -poly-L-lysine production of an S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistant mutant of *Streptomyces albulus* [J]. Seibutu Kougaku Kaishi, 1998, 76: 487~493
- 3 Mitsuaki Kito, Rika Takimoto, Toyokazu Yoshida, et al. Purification and characterization of an ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme from an ϵ -poly-L-lysine-producing strain of *Streptomyces albulus* [J]. Arch Microbiol, 2002, 178: 325~330
- 4 夏元洵. 化学物质毒性全书[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1991. 355
- 5 Itzhaki RF. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine [J]. Anal Biochem, 1972, 50: 569~574

(下转第 130 页)

0.1 mg/kg 时,回收率范围分别为禾草丹 70.7%~102.2%,克螨特 80.0%~103.6%,呋线威 68.0%~92.6%,检测限分别为 0.000 69、0.009 2、0.007 5 mg/kg,RSD 范围 7.4%~15.4%,符合残留分析要求。

参 考 文 献

- 1 Tatsuhiko Kawamoto, Nobuko Makihata. Development of a simultaneous analysis method for carbofuran and Its three derivative pesticides in water by GC/MS with temperature programmable inlet On-column Injection [J]. Analytical Sciences, 2003, 19: 1 605~1 610
- 2 Liu K H, Byoun J Y, Lee H K, et al. Simultaneous determination of furathiocarb and metabolites in biological tissues by high-performance Liquid chromatography and post-Column derivatization [J]. Chromatographia, 2001, 53: 687~690
- 3 Alice M. Au, Wallace D. Fung. Rapid Technique for thio-bencarb residue determination in rice sample[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1988, 40: 655~659
- 4 刘伊玲, 逯忠斌, 徐 威. 农药残留分析中含油脂及硫化物样品的净化方法[J]. 农药科学与管理, 2000, 21(1): 17~20

Simultaneous Determination of Thiobencarb, Propargite and Furathiocarb Residues in eel by GC-MS

Lu Shengyu, Li Jie, Liu Zhengcai, Yang Fang, Yu Kongjie

(Fujian Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT A rapid method to determine simultaneously pesticide the residues of thiobencarb, propargite and furathiocarb in eel was developed. The method consisted of extraction of samples with ethyl acetate, concentrated by nitrogen-blow, micro-partition, purified through a florisil and alumina neutral gel SPE column and determination by GC-MS. When the concentration was 0.01~0.1 mg/kg, the recoveries was from 70.7%~102.2%, 80.0%~103.6%, 68.0%~92.6% and the relative standard deviations ranged from 7.4%~15.4% ($n=6$), the detection limitation were 0.00069 mg/kg, 0.0092 mg/kg, 0.0075 mg/kg for thiobencarb, propargite and furathiocarb respectively. Reasonable recoveries for routine analysis were obtained.

Key words eel, GC-MS, pesticide residues, propargite thiobencarb, furathiocarb

(上接第 127 页)

A New Method for Activity Assay of ϵ -poly-L-Lys-degrading Enzyme

Zhao Ying, Jia Shiru, Tan Zhilei, Yuan Guodong

(Tianjin University of Science and Technology, Tianjin Key Laboratory of Industry Microbiology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT A new method that is based on the methyl orange (MeO) method for measuring the amount of ϵ -poly-L-Lys has been developed to present the activities of ϵ -poly-L-Lys-degrading enzyme. Experiments were conducted to determine the optimal reaction conditions such as temperature, incubation time, substrate concentration and buffer system. The result measured by the new method was proved to be precise. This study provided a safe and convenient method for research of ϵ -poly-L-Lys-degrading enzyme.

Key words ϵ -poly-L-Lys-degrading enzyme, enzyme activity, MeO method