

DFRKN-1 碱性磷酸酶的纯化研究

马爱瑛, 张靠稳, 贝益临, 邓蕾, 牟毅
(北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏银川 750021)

摘要:以根结线虫天敌1号分离物为提取碱性磷酸酶的材料,菌体经液氮研磨破碎后,用正丁醇抽提,硫酸铵分级沉淀分离,透析获得酶的粗提取液。再经过 DEAE-52 离子交换和 SephadexG-150 分子筛两步层析得到纯化倍数为 27.17、比活力达 10 514 U/mg 的碱性磷酸酶。

关键词:根结线虫天敌菌1号分离物;碱性磷酸酶;分离纯化

中图分类号:S181

文献标识码:A

文章编号:1004-874X(2011)02-0142-02

Purification of alkaline phosphatase of DFRKN-1

MA Ai-ying, ZHANG Kao-wen, BEI Zhan-lin, DENG Lei, MOU Yi

(College of Life Science and Engineering, North University for Nationalities, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The study aimed to isolate the alkaline phosphatase from destroying fungi of root-knot nematode-1 (DFRKN -1). It had been isolated by means of the following procedures: n-butanol extraction and ammonium sulfate fractionation, the partially purified enzyme was gained by means of ion-exchange chromatography on DEAE-52, and gel filtration chromatography on Sephadex G-150. The purification attained to 27.17 folds and the specific activity was 10 514 U/mg.

Key words: DFRKN-1; alkaline phosphatase; purification

根结线虫(*Meloidogyne spp.*)是严重制约世界农业生产发展的一类植物寄生线虫^[1],一般采用化学杀线药剂对根结线虫进行防治,虽然有较明显的效果,但化学药剂的长期使用带来了一系列的环境污染问题,如土壤农药残留的增大、地下水源的污染、病虫抗药性的增强等^[2]。因此,符合现代农业可持续发展战略理念的生物防治方法成为根结线虫治理的首选措施。张靠稳从宁夏温室黄瓜根结线虫上分离得到一株根结线虫天敌1号分离物(Destroying fungi of root-knot nematode-1, DFRKN-1),此分离物对根结线虫有较强的致病作用,该菌能够从根结线虫的卵、二龄幼虫和成虫体表直接侵入。

碱性磷酸酶广泛存在于微生物界和动物界,它在动物机体的骨化过程、磷化物和其他一些营养物质的消化、吸收、转运过程中起着重要作用。碱性磷酸酶能催化磷蛋白的水解,在细胞调节过程中具有一定作用。在生物体内,碱性磷酸酶直接参加磷的代谢活动,与磷和钙离子的消化、吸收、分泌直接相关。

本试验在前期研究的基础上^[3],对 DFRKN-1 碱性磷酸酶的纯化方法进行研究,以提高碱性磷酸酶的纯化效率,为进一步了解 DFRKN-1 碱性磷酸酶的特性奠定基础,对于深入研究 DFRKN-1 的致病机理及开发利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期:2010-07-12

基金项目:宁夏高等学校科学研究后续资助项目(2009JY004);北方民族大学科学研究项目(2008Y025)

作者简介:马爱瑛(1978-),女,硕士,讲师,E-mail:puresa@163.com

通讯作者:张靠稳(1962-),男,教授,E-mail:zkw620821@yahoo.com.cn

1.1.1 试验材料 DFRKN-1 由北方民族大学生物科学与工程学院保存。

1.1.2 试验试剂 对硝基苯磷酸二钠(PNPP)、DEAE-52、SephadexG-150、牛血清白蛋白购自北京拜尔迪;玉米粉购自超市;硫酸铵、葡萄糖、盐酸、Tris 试剂、正丁醇、氯化钠均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 碱性磷酸酶粗酶的提取 参照张靠稳等^[3]的方法略有改动:将 DFRKN-1 按 1%接种到 150 mL 玉米粉液体培养基中,于 27℃、100 r/min 的摇床中培养 3~5 d。4℃下,8 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,用预冷的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5,含 0.02 mol/L NaCl)洗涤 2~3 次。用液氮研磨破碎,再按 1:4 加入预冷的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液和正丁醇抽提,4℃、3 000 r/min 离心 20 min,上清液加入固体硫酸铵至饱和度为 30%,4℃、4 000 r/min 离心 30 min,取上清液,加入固体硫酸铵至饱和度为 70%,4℃、4 000 r/min 离心 30 min,收集沉淀。

将上述沉淀溶于 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液(4℃,pH7.5),用 0.15% NaCl 透析至无 NH_4^+ 和 S_4A_2^- 。4℃,10 000 r/min 离心 30 min,取上清液备用。

1.2.2 DEAE-52 离子交换层析 进行 DEAE-52 离子交换层析,柱床规格为 2×30 cm。用含有 0~0.5 mol/L NaCl、pH7.5 的 Tris-HCl 进行梯度洗脱,紫外监测波长为 280 nm,对各蛋白吸收峰进行酶活测定。将活性峰各管合并于 4℃保藏^[3]。

1.2.3 SephadexG-150 葡聚糖凝胶层析 收集 DEAE-52 离子交换层析活性峰进行 SephadexG-150 分子筛柱层析纯化。柱床规格为 2×30 cm。洗脱液为 pH7.5 的 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液,经 280 nm 紫外检测后,对各蛋白吸收峰进行酶活测定,收集酶活性峰部分^[4]。

1.2.4 蛋白质含量的测定 用 Lowry 法^[5]测定蛋白质含量,

以牛血清白蛋白为标准。

1.2.5 酶活力的测定 参考赵欣平等^[9]的方法进行,略有改动。

1.2.6 纯度测定 采用 SDS-PAGE 电泳测定,浓缩胶浓度为 3%,分离胶浓度为 10%。

2 结果与分析

2.1 DEAE-52 离子交换层析分离纯化

菌体经破碎、正丁醇抽提、硫酸铵分级沉淀、盐析物透析、离心后,上清液经 DEAE-52 离子交换层析得到 3 个蛋白峰(图 1),其中只有 1 个活力峰(图 2)。

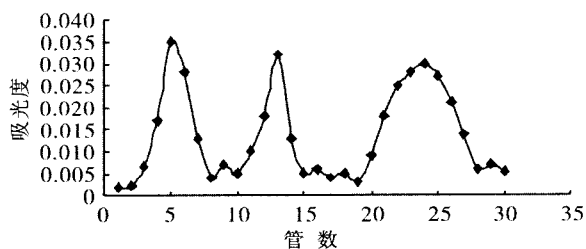


图 1 DEAE-52 离子交换层析紫外检测仪检测蛋白吸光值

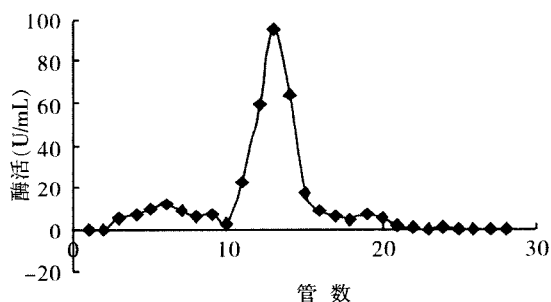


图 2 DEAE-52 离子交换层析各收集管碱性磷酸酶活性的测定

2.2 SephadexG-150 葡聚糖凝胶层析分离纯化

经 DEAE-52 离子交换分离纯化后所得的碱性磷酸酶初液,进一步通过 SephadexG-150 葡聚糖凝胶层析分离纯化得两个蛋白峰(图 3),其中只有 1 个活力峰(图 4)。纯化结果见表 1。

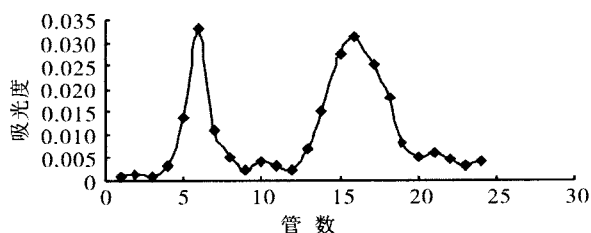


图 3 SephadexG-150 葡聚糖凝胶层析紫外检测仪检测蛋白吸光值

2.3 酶纯度的鉴定

由 SephadexG-150 柱纯化的酶液经聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,用考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色,显现单一区带(图 5)。

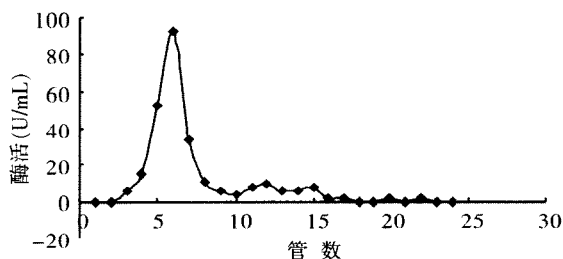


图 4 SephadexG-150 葡聚糖凝胶层析各收集管碱性磷酸酶活性的测定

表 1 根结线虫天敌真菌 1 号分离物碱性磷酸酶的纯化情况

纯化步骤	总体积 (mL)	总蛋白 (mg)	总活力 (U)	比活力 (U/mg)	纯化率 (%)
破碎后的蛋白溶液	40				
正丁醇抽提	34	24.31	9410	387	1.00
0.30 硫酸铵饱和度	32	8.21	8400	1023	2.64
0.70 硫酸铵饱和度	4	0.16	782	4887	12.63
DEAE-52 离子交换柱层析	3	0.14	766	5471	14.13
G-150 葡聚糖柱层析	3	0.07	736	10514	27.17

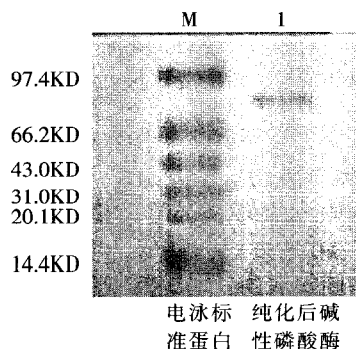


图 5 纯化后酶的电泳图

3 结语

不同研究者采用不同方法提取和纯化碱性磷酸酶。赵欣平等^[9]采用匀浆法处理白蜡虫雌虫,经过正丁醇抽提、硫酸铵分段盐析、SephadexG-150 凝胶过滤等步骤,得到了纯化倍数为 16.83 的碱性磷酸酶,经聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,用考马斯亮蓝 G₂₅₀ 染色,显现为单一区带。李遂焰等^[7]对赤子爱胜蚓碱性磷酸酶的分离纯化采用正丁醇提纯、硫酸铵分级沉淀、DEAE-纤维素柱层析、SephadexG-100 及 SephadexG-200 凝胶层析柱,得到了纯化倍数为 57.24 的碱性磷酸酶,经 PAGE 鉴定达到了电泳纯。李兴暖等^[8]以长牡蛎为酶源提取材料,用正丁醇抽提,硫酸铵分级分离,DEAE-52 和 SephadexG-150 柱层析,得到一定纯度的碱性磷酸酶,提纯倍数为 61.96。陈巧等^[6]从僧帽牡蛎中提取纯化碱性磷酸酶采用的是 SephadexG-200 凝胶过滤柱层析法,然后用快速蛋白质液相色谱(FPLC)层析为单一蛋白峰,聚丙烯酰胺凝胶电泳为单一蛋白纯酶制剂,证明该酶已达到均一程度。王静云等^[10]对小牛肠中的碱性磷酸酶的提纯没有采用传统方法,而是将一种含有碱性磷酸酶抑制剂——

(下转第 151 页)

其他条件不变的前提下,如散热片的面积一般都会有限制,由于内燃机下面排气管空间有限,过大会加大安装的难度,而通过改变散热片的形状,增大其与空气的接触面积,增加冷热交换面积,是提高散热效率的有效手段,本系统中散热器的面积为 $0.2 \times 0.2 \text{ m}^2$ 。

每 kg 汽油燃烧时约放热 46 000 kJ,以 93 号汽油为例,93 号汽油的密度为 $0.72 \sim 0.74 \text{ g/mL}$,折中取 0.73,则燃烧一升汽油放热 $0.73 \times 46000 = 33580 \text{ kJ}$ 。

2.3 吸热装置的吸热量(Q)

$$Q = \alpha \cdot A \cdot \Delta T, Q = 237 \text{ W}/(\text{m}^2 \cdot \text{C}) \cdot (0.2 \times 0.2) \text{ m}^2 \cdot (120 - 60) \text{ C} = 568.8 \text{ W} = 2048.01 \text{ kJ}$$

2.4 节能计算

资料表明:目前半导体温差发电材料的热电转化效率可达 2%,甚至是 7%,若取 2%,则能发出的电量为 $568.8 \times 0.02 \text{ W} = 11.38 \text{ W}$ 。

小型内燃机发电机一般功率为 1 000 W,1 kW·h 等于 3 600 000 kJ,也就是说每小时要消耗 $3600/33580 = 0.107 \text{ L}$ 的汽油用于小型内燃机上的发电机向蓄电池充电。温差发电装置最终给小型内燃机蓄电池充电,可算出充满 1 kW·h 的时间为 $T = 1000/11.38 \text{ h} = 87.87 \text{ h}$ 。所以,当发电时间为 87.87 h 时,可节省汽油 0.107 L,如果一辆车每天工作 6 h,那么每 15 辆车工作 1 d 就可以节省汽油 0.107 L,现在中国的小型内燃机按 6 000 万辆计算,那么 1 d 就可以节省汽油 $0.107 \times 60000000/15 = 428000 \text{ L}$,在石油供应日益紧张的今天,这可不小的数据。

3 前景展望

设计的小型内燃机尾气发电装置还有一些不足之处,其中有很大改进空间的就是温差发电片的冷端温度怎么维持低温。针对该问题,提出了以下解决的方案。

利用氨—水为工质,设计一个循环散热系统,该系统

直接贴在发电片的冷端,吸收冷端发出的热量传给氨——水蒸发冷却介质,氨—水蒸发冷却介质温度随之升高,当介质温度达到对应压力下的饱和温度时,液体蒸发冷却介质汽化,相变吸热,形成气体,介质气体沿冷却通道斜向上上升进入空气冷凝器,在空气冷凝器中与外部自然风进行热交换,冷凝后液化,重新回到装有单向流动阀的铜管的冷却通道,最后又流回温差发电片的冷端进行下一次循环。

通过此循环散热系统后,理论上温差发电片的发电效率将得到进一步提高,能更有效地利用内燃机的余热,前景广阔。

参考文献:

- [1] 顾永麟.带废热储存系统的 2T3116YII 型内燃机车冷却装置[J].国外内燃机车,2002(3):32-34.
- [2] 顾永麟.带废热储存的内燃机车用冷却装置[J].国外内燃机车,2001(5):18-23.
- [3] 曲延涛,张国强.废热重整甲醇内燃机-涡轮复合循环[J].节能技术,2005,23(3):198-201.
- [4] 张国强,曲延涛.废热裂解甲醇内燃机复合循环研究[J].节能技术,2005,23(5):14-16.
- [5] 许志建,徐行.塞贝克效应与温差发电[J].现代物理知识,2004,16(1):41-42.
- [6] 栾伟玲,涂善东.温差电技术的研究进展[J].科学通报,2004,49(11):1011-1019.
- [7] Anders Killanders, John C. Bass. A stove top generator for cold areas [A]. 15th International Conference on Thermoelectrics [C]. 1996: 390-393.
- [8] 于俊鹏,张建中,康洪波.商用温差电制冷组件用于发电的研究[J].电源技术,2003,27(6):532-535.
- [9] 曹成茂,马德贵.铅酸蓄电池充电电路设计研究[J].安徽农业大学学报,1998,25(2):200-202.
- [10] 沙占友,马洪涛,王书海,等.特种集成电源设计与应用[M].北京:中国电力出版社,2007:243-248.

(上接第 143 页)

对氨基苯磷酸的新型偶氮染料配基偶联到凝胶 Sepharose CL-6B 上,制备出新型的亲和层析介质,分离纯化小牛中的碱性磷酸酶,通过考察不同配基密度的层析介质对碱性磷酸酶的选择性,得出配基密度为 4.55 mg 配基的层析介质选择性高。用 NaCl 和 Na_2HPO_4 进行阶段洗脱,可使酶的纯化倍数一步达到 65 倍,活力回收率达到 89%。

综上所述,目前纯化碱性磷酸酶的方法主要是离子层析和凝胶层析,或者是两种方法的结合,由于亲和介质开发的限制,目前市场上不能购买到经济实用的亲和填料用于碱性磷酸酶的纯化,因此本试验在参考大量文献的基础上,采用粗体酶液进一步经过 DEAE-52 离子交换和 Sephadex G-150 分子筛两步层析,得到了纯化倍数为 27.17、比活力达 $10\ 514 \text{ U/mg}$ 的碱性磷酸酶。

参考文献:

- [1] 刘维志.植物病原线虫学[M].北京:中国农业出版社,2000.

- [2] 汪来发,杨宝君,李传道.根结线虫生物防治研究进展[J].南京林业大学学报,2002,26(1):64-68.
- [3] 张靠稳,马爱瑛.DFRKN-1 碱性磷酸酶的提取纯化和主要理化性质研究[J].安徽农业科学,2008,36(26):11181-11183.
- [4] 赵永芳.生物化学技术原理及应用[M].北京:科学出版社,2002:102-104.
- [5] 王家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000:112-118.
- [6] 赵欣平,张久源,杨守忠,等.白蜡虫碱性磷酸酶功能基因的研究[J].昆虫学报,2001,44(3):257-262.
- [7] 李遂焰,李清漪.赤子爱胜蛭碱性磷酸酶的分离纯化[J].西南交通大学学报,2002,37(5):597-600.
- [8] 李兴暖,韩雅莉,肖湘,等.长牡蛎碱性磷酸酶的分离纯化及部分性质研究[J].台湾海峡,2003,22(4):482-486.
- [9] 陈巧,陈清西,林建城,等.僧帽牡蛎碱性磷酸酶性质的研究[J].台湾海峡,2003,22(4):475-481.
- [10] 王静云,彭孝军,杨冬,等.新型染料配基对碱性磷酸酶的亲和纯化[J].高校化学工程学报,2001,15(6):563-567.