

头实际零点在中点,所以读数为零处实为负的最大读数),开始计时。随着叶片延伸生长,LVDT 的磁芯下移,输出电压改变。每隔一定时间读一次数(表头事先已经校准,读数即为生长长度),用描点法在坐标纸上画出 $l-t$ 曲线,用曲线计算生长速率。

如用自动记录仪则更为方便。将生长速率测定仪输出插孔与记录仪输入端相接,调节 LVDT 的位置,使记录笔位于左端零位,控制一定的纸速,即可随叶片生长在记录纸上画出 $l-t$ 曲线(图 6)。图中 I, II, III 是在同一小时内,用 ZS-II 型植物瞬时生长速率仪测试玉米在不同水分条件下叶子的生长曲线。从曲线可求得 I 的生长速率为 $144 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$, II 的

生长速率为 $54 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$, III 的生长速率为 $29 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ 。为了检验仪器性能,用从美国购得的 LVDT 对照实验,同时测量同一片叶子的生长速率,记录的生长曲线用 I', II', III' 表示。

参 考 文 献

- 1 潘瑞祺等合编. 植物生理学. 北京: 高等教育出版社, 1958: 249
- 2 Hsiao TC *et al.* *Science*, 1970; 168: 590
- 3 荆家海. 植物生理学通讯, 1989; (3): 58
- 4 王厚枢等编著. 传感器原理. 修订版, 北京: 航空工业出版社, 1987: 116—121
- 5 强锡富编. 几何量电测量仪. 北京: 机械工业出版社, 1981: 17—19

植物酪氨酸酶分离纯化过程中色素的去除

李新荣 汪 洛 韩 红

(南京铁道医学院生化教研室, 南京 210009)

提 要

采用新鲜马铃薯,经匀浆、过滤加入亚硫酸氢钠,制成无色素匀浆。经离心分离,硫酸铵沉淀, Sephadex G-25, DEAE-52, PAGE 制备电泳,获得无色素酶提取液。实验结果表明,用亚硫酸氢钠作为抗氧化剂有效地防止了酪氨酸酶分离纯化过程中色素的产生。

关键词 酪氨酸酶, 马铃薯, 亚硫酸氢钠

酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1 EC 1.10.3.1) 是黑色素代谢的关键酶。也是目前已知的唯一参与黑色素形成的酶。该酶存在于动物与植物组织的细胞中。酪氨酸酶是一种糖蛋白,表现出明显的不均一性。在哺乳动物体内,一般有两种活性形式,即颗粒型酪氨酸酶和可溶性酪氨酸酶,在植物和细菌只存在可溶性酪氨酸酶^[1]。酪氨酸酶广泛存在于植物,但在植物中的作用迄今仍不十分清楚。特别是在分离纯化过程中,由于大量色素的产生,影响了酶的

纯化及酶学性质的研究。对植物酪氨酸酶分离纯化过程中去除色素的研究,有助于对酪氨酸酶在植物体中生理功能的研究以及食品加工与保藏中防止食品褐变的探讨。

1 材料与方 法

1.1 酪氨酸酶的分离纯化

酪氨酸酶的分离纯化基本上参照 Teffrey

等人的方法^[2-6]。具体程序如下:

1.1.1 制备酪氨酸酶粗提液。采用新鲜马铃薯-20℃预冷 10h 后,去皮切成约 0.5 cm 至 1cm 的碎片。加入 5 倍体积的 4℃ 0.01mol/L pH 6.8 磷酸盐缓冲液(含亚硫酸氢钠,终浓度为 0.5%), 10000 r/min 匀浆 3 min, 纱布过滤后 12000g 离心 30 min (高速冷冻离心机),制成无色匀浆。

1.1.2 酶的粗提液上清部分用 60% 饱和硫酸铵沉淀, 4℃ 放置 10h。

1.1.3 12000g 离心 30 min, 弃去上清留取沉淀部分。

1.1.4 取沉淀加 5 倍体积的 0.01 mol/L pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释,经 Sephadex G-25 (2.5 cm × 60 cm) 脱盐及除去小分子物质,得到较高酶活性无色素的酪氨酸酶提取液。

1.1.5 将 DEAE-52 置入酶提取液中, 4℃ 吸附 10h, 装柱 (2.5 cm × 20 cm) 以起始缓冲液洗脱至无杂蛋白后,进行 NaCl 线性洗脱。梯度为 0—0.7 mol/L, 收集具有酶活性的各管。

1.1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)。用 7% 胶, 胶板 10cm × 12cm × 0.5cm, 恒流 20 mA, 电泳 6h。电极缓冲液为 0.1 mol/L Tris-甘氨酸 pH 8.3。酶活性显色后,切下与酶活性带相应的部分匀浆提取。

1.2 酪氨酸酶活性测定

酪氨酸酶活性测定采用 Wayne 等人的方法^[9-12]。37℃ 测定反应达 1min 时,在 475 nm 处的吸光度,然后根据多巴色素 (dopachrome) 在 475 nm 的消光系数计算出酶的活力单位。

酶活力单位 (u): 37℃ 1min 转变 L-DOPA 生成 1 μmol/L 多巴色素为一个酶活力单位。

1.3 蛋白测定方法

采用 Lowery 法,以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

2 结果与讨论

酪氨酸酶广泛存在于植物中,它催化酪氨酸、儿茶酚等酚类物质转变为醌类,再聚合成黑色素。当植物细胞处于完整状态时,酚和醌之

间保持着动态平衡,当细胞壁被破坏之后,空气的氧大量侵入,造成醌的形成和反应之间的不平衡,于是醌大量积累,从而聚合成黑色素。在植物酪氨酸酶的分离纯化过程中,由于植物细胞壁受到破坏,在酶的粗提液制备过程中形成黑色素,后者与酶蛋白结合,这不仅给酶的分离纯化造成一定困难,同时由于色素的存在,也影

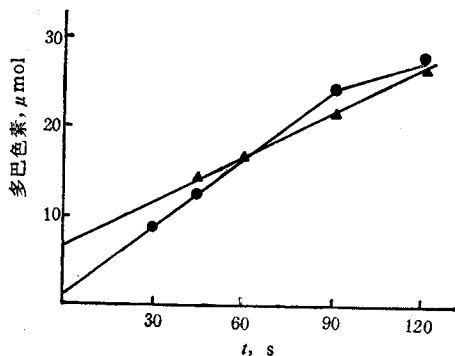


图 1 亚硫酸氢钠对马铃薯酪氨酸酶活性的影响

▲: 未加亚硫酸氢钠, 经 Sephadex G-25 柱层析后的酪氨酸酶粗提液 ●: 加亚硫酸氢钠, 经 Sephadex G-25 柱层析后的酪氨酸酶粗提液

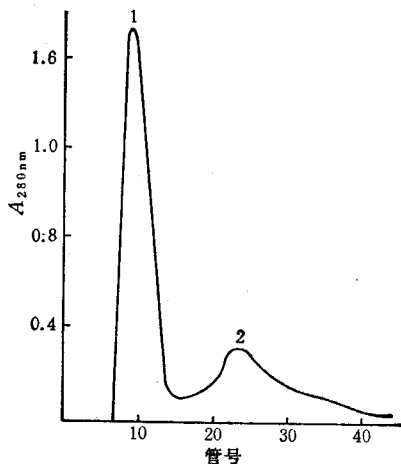


图 2 含亚硫酸氢钠的酪氨酸酶在 Sephadex G-25 柱的洗脱图

上样量 13 ml, 4ml/管

峰 1 为具酪氨酸酶活性蛋白峰

响了酶学性质的研究。Bouchilloux 等^[13]曾提出加入碱式乙酸盐 (subacetate) 去除结合的黑色素蛋白。这种方法不能完全除去黑色素,而且酶蛋白损失大。在实验中,我们根据植物酪氨酸酶反应的特点,选择了较温和的抗氧化剂

亚硫酸氢钠, 在植物酪氨酸酶粗提液的制备过程中加入到缓冲液中, 可防止色素的形成。当酶的粗提液经过 Sephadex G-25 柱层析去除亚硫酸氢钠后, 酶活性重新恢复(图 1)。表明亚硫酸氢钠对酪氨酸酶的抑制作用是可逆的。

加亚硫酸氢钠的酪氨酸酶粗提液经过滤、离心及 60% 饱和度硫酸铵沉淀后在 Sephadex G-25 柱的分离情况见图 2, 在 7—15 管处有一个酶的活性组分。

由于经 Sephadex G-25 柱层析后, 小分子底物被除去, 因此就避免了在亚硫酸氢钠去除

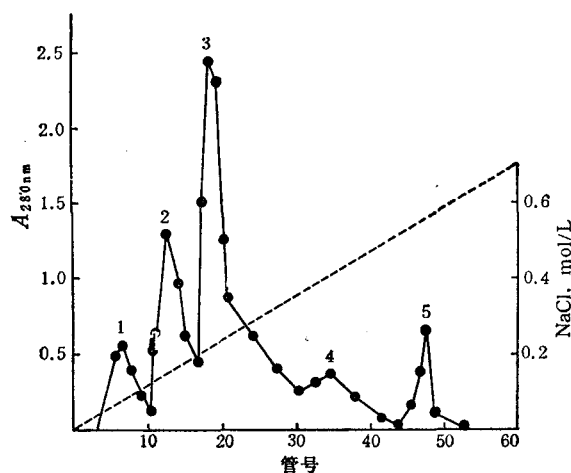


图 3 去除亚硫酸氢钠的酪氨酸酶提取液在 DEAE-52 柱的洗脱图

4ml/管, 峰 3 为具有酪氨酸酶活性蛋白峰

后色素的生成, 得到无色素且有较高酶活性的酪氨酸酶提取液。采用此阶段收集的酪氨酸酶进行酶动力学性质研究, 取得了较好的实验结果。

收集 Sephadex G-25 柱层析具有酪氨酸

表 1 马铃薯酪氨酸酶的分离纯化

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总活力 (U)	比活力 (U/mg)	纯化倍数	产率 (%)
12000g 离心上清	572				
60% 硫酸铵沉淀	107				
Sephadex G-25	97	6710	69	1 ¹⁾	100 ¹⁾
DEAE 52	30	4160	138	2	61
PAGE	2.5	2343	937	13	34

1) 加亚硫酸氢钠后, 酪氨酸酶活性完全被抑制, 故酶活力计算是从 Sephadex G-25 柱层析除去亚硫酸氢钠开始。因此, 纯化倍数与产率均以 Sephadex G-25 柱层析作为第一步计算, 并不能确切代表整个分离纯化的纯化倍数与产率。

酶活性的各管洗脱液经 DEAE-52 柱层析的分离情况见图 3。

收集具有酪氨酸酶活性的组分经浓缩胶浓缩后, PAGE 电泳, 即得到电泳纯的酪氨酸酶的组分, 各步纯化结果见表 1。

参 考 文 献

- Garcia B, Solano F, Iborra J L. *J Biochem*, 1985; 228: 95
- Jesus D. *J Biochem*, 1982; 205: 397
- Tomita Y, Hariu A, et al. *Arch Biochem Biophys*, 1983; 225: 75
- Charles R. *Methods in Enzymol*, 1955; 2: 817
- Kanagy J, Vanderkooi J M. *Arch Biochem*, 1988; 267: 668
- Vachtenheim J. et al. *Arch Dermatol Res*, 1984; 267: 111
- Iborra J et al. *J Biochem*, 1981; 244: 1593
- Yamamoto H, John A B. *Biochim Biophys Acta*, 1984; 800: 282
- Gaulton GN et al. *J Biochem*, 1983; 258: 14845
- Vachtenheim J et al. *Comp Biochem Biophys*, 1987; 87B, 4: 709
- Wayne T. *Anal Biochem*, 1984; 139: 345
- Vachtenheim J et al. *Anal Biochem*, 1985; 146: 405
- Bouchilloux S, McMachill P, Mason H S. *J Biol Chem*, 1963, 238: 1699

(Continued from page 130)

Experimental result shows that the acute gastric mucosal lesion is related to the change of serum gastrin. When the acute gastric mucosal lesion of rats was induced by indomethacin, the serum gastrin level was increased obviously. The drug crude riboflavin preparation could decreased the release of serum gastrin caused by indomethacin.

Key words Indomethain, Gastric mucosa, Acute gastric mucosal lesion, Serum gastrin, Crude riboflavin preparation, Prostaglandin.