

鹰嘴豆 β -半乳糖苷酶的分离纯化与表征*

李绪渊 赵克浩** 孟廷发¹ 涂伟霞

(兰州大学化学系,¹ 生物系, 兰州 730000)

摘要 从鹰嘴豆中分离得到了三种 β -半乳糖苷酶(酶 I、酶 II 和酶 III)。将酶 I 和酶 II 进一步纯化, 其比活力分别提高了 19 倍和 48 倍, 酶活力回收率分别为 16% 和 18%, 测得它们的表现分子量分别为 2.4×10^4 和 5.8×10^4 , 最适 pH 分别为 5.9 和 5.0, 最适温度分别为 55 °C 和 45 °C。酶 I 水解 ONPG 和 PNPG 的 K_M 分别为 $3.3 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 和 $6.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; 酶 II 水解 ONPG 和 PNPG 的 K_M 分别为 $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 和 $6.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 。乳糖和半乳糖为该酶的竞争性可逆抑制剂, 棉子糖为非竞争性可逆抑制剂。该酶受 Hg^{2+} 和 PCMB 强烈抑制和 NEM 明显抑制, 而 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 具有激活作用, 推知巯基 (-SH) 是酶活性中心必须基团。

关键词: β -半乳糖苷酶, 鹰嘴豆, 分离纯化, 表征, 酶催化作用

糖苷酶广泛存在于动植物体内, 因其具有异头及糖苷键结构的特异性, 在多种糖类降解^[1,2]、有机合成^[3,4]及生物生理^[5,6]等诸多方面具有重要意义, 近年来引起人们广泛关注, 成为生物化学和酶催化化学重要研究课题。然而, 有关鹰嘴豆中 β -半乳糖苷酶的研究, 迄今未见报导。本文采用硫酸铵分级沉淀、纤维素柱层析, 从植物鹰嘴豆中分离得到了三种 β -半乳糖苷酶(酶 I、酶 II 和酶 III), 就其中酶 I 和酶 II 进行了离子交换纯化, 测定了纯化的酶 I 和酶 II 的纯度、比活性、酶活回收率、表现分子量、最适 pH 和最适温度, 以及水解邻硝基苯酚- β -D-半乳糖苷 (ONPG) 和对硝基苯酚- β -D-半乳糖苷 (PNPG) 的米氏常数 K_M 。考察了几种化合物和金属离子对酶活性的影响, 推知巯基 (-SH) 是酶活性中心必需基团。并对乳糖、半乳糖和棉子糖的抑制作用进行了测定和讨论。

1 材料与方方法

(1) **物料与试剂** 鹰嘴豆购自甘肃省土特产公司, 浸泡 24 小时, 25 °C 暗培养发芽备用。DEAE-纤维素 (DE-32), CM-纤维素 (CM-52) 为 Whatman 公司产品; Sephadex G-200 为 Pharmacia Fine Chemicals 产品; 丙烯酰胺 (Acr) 为 Merck 公司产品; N,N' -亚甲双丙烯酰胺为 Serva Feinbiochemica Heidelberg 产品; 考马斯亮蓝 R-250, 对硝基苯酚- β -D-半乳糖苷 (PNPG), 邻硝基苯酚- β -D-半乳糖苷 (ONPG), PNP- α 和 β -D-甘露糖苷, PNP- α 和 β -D-葡萄糖苷均为 Sigma 产品; 其它试剂为国产分析纯或化学纯。

(2) **蛋白质含量分析** 采用 Lowry 法^[7], 以牛血清白蛋白 (BSA) 作标准, 用紫外分光光度计测定 280nm 处的吸光值。

1995-11-13 收到初稿, 1996-03-15 收到修改稿。联系人: 李绪渊。* 国家自然科学基金资助项目

** 现在中国科学院生物物理研究所

(3) **分子量测定** 采用凝胶过滤法, Sephadex G200 柱 (15cm×96cm), 用含 $0.01\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl 的 $0.01\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pH6.0 的磷酸缓冲液 (PBS) 充分平衡, 流速 $12\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$. 将不同分子量的标准蛋白上柱测得各自的 V_e , 将 Blue dextran ($M_r > 2 \times 10^6$) 上柱测得 V_0 , 以 V_e/V_0 对 $\log M_r$ 作工作曲线; 在同样条件下测定酶 I 和酶 II 的 V_e , 依其 V_e/V_0 值及工作曲线求其分子量.

(4) **聚丙烯酰胺凝胶电泳** 按文献^[8] 采用垂直板电泳, 分离胶浓度 7% (质量分数, 下同), pH8.8; 浓缩胶浓度 4%, pH6.8; 电极缓冲液浓度 $0.025\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, pH8.3; 用考马斯亮蓝 R-250 染色.

(5) **SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳** 按文献^[9], 采用 Laemmli 方法进行.

(6) **酶活力测定** 以酶水解底物 ONPG 生成邻硝基苯酚 (ONP) 为指示反应, 反应液总体积 0.5mL (含 pH4.0, $0.1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 柠檬酸缓冲液, $5\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ONPG 及酶液), 50°C 准确反应 20 分钟, 加入 1.5mL $1.0\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Na_2CO_3 终止反应, 于 405nm 处测定吸光值, 以改变 0.01 个吸光度值定义为一个酶活力单位 (u). 在计算酶促反应动力学常数时, 以每分钟释放 ONP 的 μmol 数表示酶活力和酶催化反应速度. 比活力以每毫克蛋白 (酶) 所具有的活力单位数表示.

(7) **柱层析蛋白质洗脱峰检测** 用 FH8802 紫外检测仪检测, 波长 280nm.

2 结果与讨论

2.1 β -半乳糖苷酶的纯化

收集培养 7 天的鹰嘴豆黄化苗, 加 2 倍体积的含有 $1\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ EDTA-Na 和 3% 甘油 (V/V) 的 $0.01\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pH6.4 PBS, 低温下高速捣碎, 置冰箱中缓慢抽提 2 小时, 过滤后清液于 $77000\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 0.5 小时, 收集上清液进行硫酸铵分级 (30~70% 饱和度) 沉淀. 将沉淀溶解于 $0.01\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pH6.4 PBS 中, 流水透析脱盐, 适当浓缩后上入已用 $0.01\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pH6.4 PBS 充分平衡的 DEAE-纤维素柱 (Cl^- 型, $2.4\text{cm}\times 25\text{cm}$), 用同样缓冲液洗脱 (流速 $0.4\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), 分管收集, 经检测获得酶活力峰即酶 I. 换用 $0\sim 0.6\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl 的同样缓冲液进行直线梯度洗脱, 经检测获得二个酶活力峰, 即酶 II 和酶 III (见图 1).

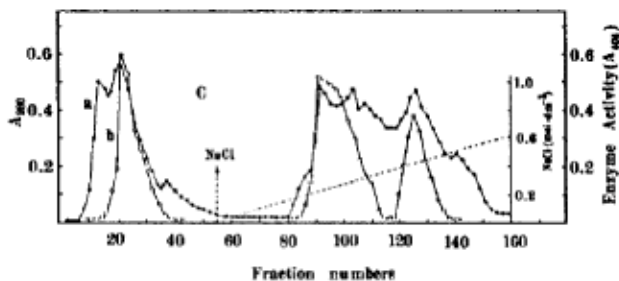


图 1 β -半乳糖苷酶 DEAE-纤维素-32 柱层析图
Fig.1 Elution profile on DEAE-cellulose-32 chromatography of β -galactosidase activity

a) Absorption at 280nm;
b) β -galactosidase activity

上述层析所得酶 I 和酶 II 再经 $0.01\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pH5.0 柠檬酸缓冲液透析, 适当浓缩后, 上入已用 $0.01\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pH5.0 柠檬酸缓冲液平衡的 CM-纤维素柱 (Na^+ 型, $2.4\text{cm}\times 24\text{cm}$), 用 $0\sim 0.5\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl 的平衡缓冲液进行直线梯度洗脱, 收集含有酶活力部分, 得到纯化的酶 I 和酶 II. 纯化步骤及结果见表 1. 纯化了的酶 I 和酶 II 的比活力比抽提液分别提高了 19 倍和 48 倍. 这与 Biswas^[10] 提取的 β -半乳糖苷酶相仿, 而步骤较之简练. 酶 III 很不稳定, 本文未做进一步纯化.

2.2 纯度分析

本文用五种人工合成糖苷 (PNP- α -D-半乳糖苷, PNP- α 和 β -D-葡萄糖苷, PNP- α 和 β -D-甘露糖苷) 为底物测定了纯酶中相应的糖苷酶活力. 结果表明, 纯酶中只含有极微弱的 α -葡萄糖苷酶活力. 纯化的酶 I 和酶 II 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 均显示单一条蛋白着色带 (图 2); 经 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色也显示为单一条蛋白带; Sephadex G-200 层析亦表现为单一蛋白峰. 这些结果均表明纯化的酶 I 和酶 II 是两种均一的 β -半乳糖苷酶; 并且, 两种酶均由单一条多肽链构成.

表 1 β -半乳糖苷酶纯化步骤及结果

Table 1 Summary of purification procedure of β -galactosidase

Purification step	Enzyme Volume (dm ³ × 10 ⁻³)	Total activity (u)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Purification factor	Recovery activity (%)
Crude extract	700	9160	329	28	1	100
Ammonium sulfate	34	6120	153	40	1.4	67
DEAE-cellulose	E I	61	1750	18	96	3.4
Chromatography	E II	130	2938	65	45	1.6
	E III	40	1624	37	44	1.6
CM-cellulose	E I	83	1450	2.8	518	18.5
Chromatography	E II	89	1624	1.2	1353	48.3

2.3 分子量测定

采用 Sephadex G-200 凝胶过滤法测定 β -半乳糖苷酶的分子量, 用已知分子量的标准蛋白实验所得工作曲线如图 3 所示. 依工作曲线, 实验测得酶 I 和酶 II 的表观分子量分别为 2.4×10^4 和 5.8×10^4 . 后者与虹豆中该酶的分子量相同^[11], 而与蚕豆中该酶的分子量相近^[6].

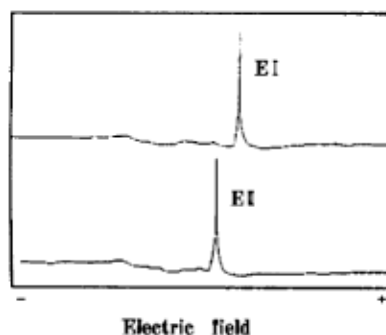


图 2 纯化的 β -半乳糖苷酶 I 和 II 的聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图

Fig.2 Scanning profile of purified β -galactosidase I and II after polyacrylamide gel electrophoresis

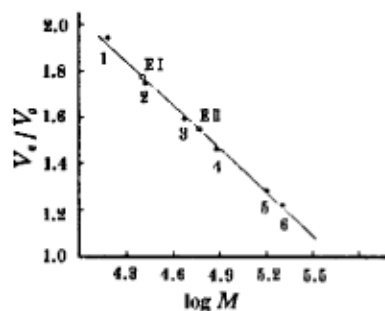


图 3 β -半乳糖苷酶分子量测定工作曲线

Fig.3 Plot of molecular mass determination of β -galactosidase
1) Cytochrome C; 2) Chymotrypsinogen; 3) Hen Egg Albumin; 4) BSA; 5) Aldolase; 6) Catalase; EI: Purified β -galactosidase; EII: Purified β -galactosidase

2.4 最适 pH 和最适温度

在 50 °C, pH2~10 范围的柠檬酸 - 磷酸缓冲液中, 测定 β - 半乳糖苷酶 I 和 II 水解 ONPG 的酶活力, 结果如图 4 所示. 由图看出, 酶 I 和酶 II 分别在 pH5.9 和 pH5.0 左右有最大酶活力, 它们的酶活性酸碱稳定区约为 pH4.5~7.5 和 pH4.0~7.5.

在最适 pH 条件下, 本文测定不同温度时酶 I 和酶 II 水解 ONPG 的酶活力, 结果见图 5. 可以看出, 酶 I 在 55 °C 时活力最高, 而酶 II 在 45 °C 时活力最高; 并且, 它们对温度都有较高敏感性, 表现酶活力为 80% 以上的温度都比较窄, 酶 I 大致在 47.5~61.5 °C 以内, 酶 II 在 36.5~55.5 °C 之间.

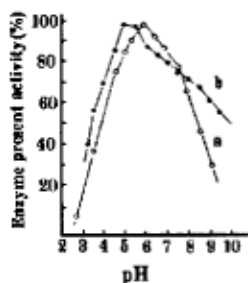


图 4 pH 对 β - 半乳糖苷酶活性的影响

Fig.4 Effect of pH on β -galactosidase activity

- a) β -galactosidase I
- b) β -galactosidase II

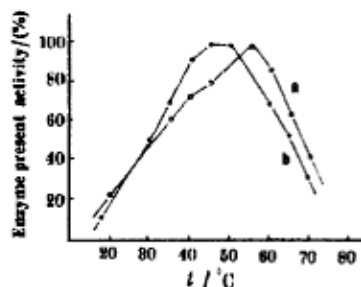


图 5 β - 半乳糖苷酶活性与温度的关系

Fig.5 Relationship between β -galactosidase activity and temperature

- a) β -galactosidase I
- b) β -galactosidase II

2.5 一些金属离子和化合物对酶活性的影响

本文测定了不同浓度 KCl、MgCl₂、CaCl₂、ZnCl₂、HgCl₂、FeCl₃, 对氯汞苯甲酸 (PCMB) 和 N- 乙酰顺丁烯二酰亚胺 (NEM) 对 β - 半乳糖苷酶活性的影响, 结果见表 2. 可以看出, Mg²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺ 和 K⁺ 都不抑制酶活性, 并有不同的激活作用. 而 Hg²⁺ 和 PCMB 强烈抑制酶活性, Fe³⁺ 和 NEM 也有明显抑制作用. 据此, 本文推知巯基 (-SH) 是为鹰嘴豆 β - 半乳糖苷酶活性中心必需基团.

2.6 米氏常数 K_M 和抑制常数 K_i 测定

本文在 50 °C 及 pH5.0 的缓冲体系中, 保持总体积及酶量不变, 分别测定了酶 I 和酶 II 水解不同浓度 PNPG 和 ONPG 的酶活力, 并以酶活力表示反应速度, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 求得酶 I 水解 PNPG 和 ONPG 酶促反应的米氏常数 K_M 分别为 $6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 和 $3.3 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 酶 II 水解 PNPG 和 ONPG 的米氏常数 K_M 分别为 $6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 和 $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. 本文鹰嘴豆 β - 半乳糖苷酶的这些 K_M 值与 Simos^[12] 等人所测玉米粉、黑麦、菠菜及大麦芽中 β - 半乳糖苷酶水解 ONPG 的 K_M 值较为相近而又有所不同. 这可能是植物种属不同, 造成其酶的功能基因及其结构境遇不尽相同所致.

此外, 本文还研究了底物类似物棉子糖、乳糖和 D- 半乳糖对纯化的酶 I 和酶 II 水解 ONPG 的抑制作用. 结果表明, 三种底物类似物均表现为可逆性抑制作用, 其中乳糖和 D- 半乳糖为竞争性抑制, 而棉子糖为非竞争性抑制. 这与龚笑梅^[6] 等研究这三种底物类似物抑制蚕豆中 β - 半乳糖苷酶水解 ONPG 结果一致. 本文按照 Michaelis-Menten 机理, 并采用 Lineweaver-Burk

双倒数法作图,求得乳糖、D-半乳糖和棉子糖抑制酶 I 水解 ONPG 的抑制常数 K_i 分别为 $12.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 、 $6.9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 和 $68.8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$,抑制酶 II 水解 ONPG 的抑制常数 K_i 分别为 $11.7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 、 $9.3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 和 $57.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.可以看出,三种底物类似物抑制鹰嘴豆 β -半乳糖苷酶水解 ONPG 的强弱次序为 D-半乳糖、乳糖和棉子糖.

表 2 一些金属离子和抑制剂对 β -半乳糖苷酶活性的影响
Table 2 Effect of ions and inhibitors on β -galactosidase activity

Reagent	β -galactosidase I		β -galactosidase II	
	Concentration	Relative activity	Concentration	Relative activity
KCl	10×10^{-3}	91.6	6×10^{-3}	120
	20×10^{-3}	96.5		
	40×10^{-3}	98.8		
MgCl ₂	5×10^{-3}	100.4	6×10^{-3}	122
	10×10^{-3}	104.2		
	20×10^{-3}	112.5		
CaCl ₂	5×10^{-3}	101	6×10^{-3}	103
ZnCl ₂	5×10^{-3}	101	5×10^{-3}	108
	10×10^{-3}	106		
	20×10^{-3}	108		
HgCl ₂	1×10^{-3}	16	6×10^{-3}	13.5
	2.5×10^{-3}	0		
	5×10^{-3}	0		
FeCl ₃	1×10^{-3}	55.4	—	—
	5×10^{-3}	44.8		
	10×10^{-3}	18.8		
PCMB	0.1×10^{-3}	0	—	—
	0.5×10^{-3}	0		
	1×10^{-3}	0		
NEM	1×10^{-3}	68	—	—
	5×10^{-3}	47		
	10×10^{-3}	42		

参 考 文 献

- 1 Dey P M, Delcampillo E. *Adv. Enzymol.*, **1984**, **56**:141
- 2 Edwards M, Bowman Y J L, Dea I C M, et al. *J. Bilo. Chem.*, **1988**, **263**:4333
- 3 Piescecki S, Teng W Y, Hochuli E. *Biotech. Bioeng.*, **1993**, **42**:128
- 4 Nilsson K G I. *Carbohydr. Res.*, **1988**, **180**:53
- 5 Kobata A. *Bio. Carbohydrates*, **1984**, **2**:131
- 6 龚笑梅, 孙册等. *生物化学与生物物理学报*, **1991**, **2**:157

- 7 Lowry O H, Rosebroagh N J, Farr A L, *et al.* *J. Bio. Chem.*, **1951**, **193**:265
- 8 Reisfeld R A, Lewis V J, Williams D E. *Nature*, **1962**, **195**:281
- 9 Laemmli U K. *Nature*, **1970**, **227**:680
- 10 Biswsa T K. *Phytochemistry*, **1987**, **2**:359
- 11 Biswas T K. *Phytochemistry*, **1985**, **12**:2831
- 12 Simos G, Giannakouros T, Georgatsos J G. *Phytochemistry*, **1989**, **10**:2578

Purification and Characterization of β -galactosidases from *Cicer Arietinum*

Li Xuyan Zhao Kehao Meng Yanfa¹ Tu Weixia

(Department of Chemistry and ¹Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract Gram chicken bean exhibits a high level of β -galactosidase activity, and the three components contained in it are responsible for this activity. β -galactosidase I, II and III were separated by ammonium sulphate fractionation (30%–70% saturation) and by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose-32. β -galactosidase I and II, in particular, were purified by subsequent chromatography on CM-cellulose-52. Specific activities of them were improved by 19 times and 48 times, meanwhile, recovery activities were 16% and 18% respectively. The two enzymes were homogeneous as judged by polyacrylamide gel electrophoresis and Sephadex G-200 molecular sieve chromatography. Their molecular weights were determined to be 24 000 and 58 000 respectively. β -galactosidase I had an apparent K_M of $6.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ for *p*-nitrophenyl- β -D-galactoside (PNPG) and $3.3 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ for *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG). β -galactosidase II had an apparent K_M of $6.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ for PNPG and $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ for ONPG. Galactose and lactose both competitively inhibited the activity of enzymes. Raffinose uncompetitively inhibited the activity of enzymes. Ions Mg^{2+} , Zn^{2+} and Ca^{2+} stimulated the activity. The two enzymes were markedly inhibited by Hg^{2+} , PCMB and NEM, which suggested that tryptophan (–SH) was necessary for enzyme function.

Keywords: β -galactosidase, *Cicer arietinum*, Purification, Characterization, Enzyme catalytic function