刀豆、黑豆脲酶的分离与基本性质研究

张宽朝,阮 飞,金 青,文 汉

(安徽农业大学 生命科学学院,安徽 合肥 230036)

摘 要:为加深对豆科植物脲酶的了解,对刀豆、黑豆脲酶进行了分离纯化和基本性质的比较研究。结果表明:刀豆、黑豆脲酶粗酶液经石油醚脱脂、冷丙酮沉淀、饱和硫酸铵分级沉淀、透析脱盐、DE-52 阴离子交换层析后,纯化倍数分别为3.851和3.36,回收率分别为5.35%和11.27%。反应进程曲线表明,在15 min以内,反应产物与反应时间基本成线性关系。刀豆、黑豆脲酶的 K_m 分别为 1.3×10^{-2} 和 2.4×10^{-3} mol·L^{-1},最适pH分别为7.0和6.0,酸碱稳定范围分别为pH6.0~7.0和pH5.0~8.0。

关键词:刀豆;黑豆;脲酶;分离纯化;基本性质

中图分类号:S565.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9841(2013)03-0361-04

Separation and Properties of Urease in Sword Bean and Black Soybean

ZHANG Kuan-chao, RUAN Fei, JIN Qing, WEN Han

(School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In order to explore the urease in leguminaceous plant, the purification and properties of urease in sword bean (*Canavalina* sp.) and black soybean (*Glyeine soja* Sieb. et Zucc) were studied. Urease were isolated and purified by mineral ether-degrease, cold acetone deposition, sulfate grade deposition, dialyseion and exchange chromatography. Purification multiple of ureases from sword bean and black soybea was 3.851 and 3.36, recovery was 5.35% and 11.27%. The chart of ureases reaction showed that the output and reaction time was linear in 15 min. The K_m values of sword bean and black soybea were 1.3×10^{-2} and 2.4×10^{-3} mol·L^{-1}, while the optimum pH were 7.0 and 6.0, and the pH stability were 6.0-7.0 and 5.0-8.0.

Key words: Sword bean; Black soybean; Urease; Separation; Property

刀豆,又名大刀豆、挟剑豆、刀鞘豆等,为豆科一年生缠绕草质藤本植物刀豆的成熟种子。在我国江苏、安徽、浙江、江西、台湾、湖北、湖南、广东、广西、陕西、四川等省区均有分布。黑豆,也称马豆、黑大豆等,因其种皮呈黑色而得名。由于具有耐旱、耐瘠、适应性广、营养价值高等特点,黑豆在中国的大部分地区都有种植。

脲酶,也称尿素酶,一种氨基水解酶,能将尿素(脲)分解为氨和二氧化碳或碳酸铵,其催化反应速率比无脲酶非催化反应速率大 10^{14} 倍[1]。自然界中脲酶广泛存在,主要分布于植物的种子中,但以大豆、刀豆中含量丰富,也存在于动物血液和尿中,某些微生物也能分泌脲酶。作为重要的生物制剂,脲酶在医学、畜牧业、环保等方面都有很广泛的应用,其不仅可用于医疗诊断(如测定尿和血液中的尿素),还可用以检测牛乳粉中大豆粉含量、处理尿素废水等[2-4]。而目前我国所需商品化脲酶产品主要依赖进口[4-5]。本试验对刀豆、黑豆脲酶进行了提取、分离及部分纯化,并对刀豆、黑豆脲酶的部分酶学性质进行了比较研究,以便进一步加深对豆科植物刀豆、黑豆中脲酶的了解,同时为解决脲酶的国产化问题提供一定的技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与药品

1.1.1 材料 试验材料为市售黑豆、刀豆。

1.1.2 主要仪器 722S分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;自动部分收集器,上海青浦沪西仪器厂;核酸蛋白检测仪,南京新校园生物技术研究所;梯度混合器,上海沪西分析仪器厂;数显恒温水浴锅,国华电器有限公司。

1.1.3 试剂 DE-52为Whatman分装产品,透析袋为Usa分装产品;硫酸铵、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、EDTA-Na、Tris、盐酸、氢氧化钠、氯化钠、考马斯亮蓝G-250等,均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 脲酶活性测定 酶活测定采用苯酚钠法。将1 mL底物与1 mL酶液分别于35℃预热5 min后混合,摇匀,35℃ 反应15 min后,加0.1 mol·L^{-1} HCl 0.5 mL终止反应,加入2 mL苯酚钠,1.5 mL NaOCl 35℃ 发色30 min,于630 nm处测定OD值

收稿日期:2013-01-31

第一作者简介:张宽朝(1981-),男,硕士,实验师,主要从事生物化学研究。E-mail:zhangkch1980@126.com。

通讯作者:文汉(1963-),男,副教授,硕士生导师,主要从事天然产物与次生代谢研究。E-mail:swhx12@ahau.edu.cn。

(空白以磷酸盐缓冲液代替酶液)。以反应时间内 $OD_{630\ nm}$变化 1.0 为 1 个酶活单位(U)。

1.2.2 蛋白质浓度测定 采用考马斯亮蓝染色法[6],略有修改。以 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$牛血清白蛋白为标准蛋白液,用 0.9% 生理盐水补充体积。以不同浓度牛血清白蛋白(BSA)相对应的 595 nm 的吸光值为纵坐标,蛋白质含量为横坐标,作标准浓度蛋白质曲线,其回归方程为 $y = 0.006x + 0.005\ 8, R^2 = 0.967\ 1$。

1.2.3 脲酶的分离纯化 黑豆或刀豆种子去皮,捣碎成细粉状。取粉末 10 g,加 40 mL 60 ~ 90℃沸程的石油醚浸泡 30 min,循环水真空泵抽滤,去滤液。加 40 mL 60 ~ 90℃沸程的石油醚浸泡 30 min,抽滤,得脱脂粗豆粉。

将经过粗提的脱脂豆粉加 50 mL 纯水,4℃冰箱放置过夜,纱布过滤,滤液 4 000 $r \cdot min^{-1}$离心 15 min,去沉淀。上清液缓慢加 4 倍体积冷丙酮,4 000 $r \cdot min^{-1}$离心 15 min,去上清,沉淀以 100 mL 纯水复溶。

复溶液加入固体硫酸铵粉末至 30% 饱和度,4 000 $r \cdot min^{-1}$离心 15 min,去沉淀。上清液中加固体硫酸铵粉末至 60% 饱和度,4 000 $r \cdot min^{-1}$离心 15 min,倾去上清液,沉淀溶于 30 mL 0.006 7 $mol \cdot L^{-1}$ pH7.0 磷酸盐缓冲液。

用 0.006 7 $mol \cdot L^{-1}$ pH7.0 磷酸盐缓冲液透析,4℃冰箱过夜后,将透析液上 DE-52 层析柱。以 0 ~ 1.0 $mol \cdot L^{-1}$NaCl,0.006 7 $mol \cdot L^{-1}$ pH7.0 的磷酸盐缓冲液梯度洗脱,自动部分收集器每 5 min 收集 1 管,测定酶活性。

1.2.4 进程曲线的制作 各试管分别加入 1 mL 10% 尿素,并与酶液在 35℃恒温水浴中同时预热。精确计时 5 min 后,取 1 mL 酶液加入各管内,剧烈摇匀,然后按 5,10,15,20,25,30,40,60 min 的时间间隔加 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ HCl 0.5 mL 终止反应,分别加入 2 mL 苯酚钠溶液和 1.5 mL NaOCl 溶液,充分摇匀,空白以 1 mL 缓冲液代替酶液,35℃反应 20 min。以空白作对照,630 nm 比色测定。以反应时间为横坐标,OD_{630}为纵坐标作进程曲线。

1.2.5 米氏常数 K_m的测定 分别取 10,20,30,40 $mmol \cdot L^{-1}$尿素各 1 mL 加入试管中,与酶液管一同在 35℃恒温水浴中预热,逐管计时 5 min,各管加酶液 1 mL。35℃恒温水浴反应 15 min,加入 0.1 $mol \cdot L^{-1}$HCl 0.5 mL 终止反应,加 2 mL 苯酚钠溶液和 1.5 mL NaOCl 溶液,35℃反应 20 min。630 nm 处比色测定 OD 值。以 1/V 为纵坐标,1/[S]为横坐标,由直线在横轴上的交点为 $-1/K_m$,计算得 K_m。

1.2.6 pH 对酶活的影响 取 pH5.0,6.0,7.0,8.0,9.0 缓冲液各 1.8 mL 分别加入试管中,并各加入尿素 0.2 mL、酶液 0.2 mL,35℃恒温水浴反应 15 min,加 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ HCl 0.5 mL 终止反应后,加 2 mL 苯酚钠溶液和 1.5 mL NaOCl 溶液,35℃反应 30 min。630 nm 处比色测定 OD 值。以反应 pH 为横坐标,OD_{630}为纵坐标,作 pH 对酶活影响曲线。

1.2.7 脲酶酸碱稳定性的研究 取 pH5.0,6.0,7.0,8.0,9.0 缓冲液各 0.2 mL 分别加入试管中,并加入酶液 0.2 mL,35℃恒温水浴反应 60 min,分别于各管加入 pH7.0,0.067 $mol \cdot L^{-1}$磷酸盐缓冲液 1.6 mL及 50% 尿素 0.2 mL,35℃反应 15 min,加 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ HCl 0.5 mL 终止反应后,加 2 mL 苯酚钠溶液和 1.5 mL NaOCl 溶液,35℃反应 30 min。630 nm 处比色测定 OD 值。以处理 pH 为横坐标,OD_{630}为纵坐标,绘制 pH 稳定曲线。

2 结果与分析

2.1 脲酶的分离纯化

刀豆、黑豆脲酶粗酶液经过石油醚脱脂、冷丙酮沉淀、饱和硫酸铵分级沉淀、透析脱盐过夜、DE-52 阴离子交换层析等步骤的分离纯化,收集获得纯化后酶活峰。从图 1、图 2 中可以看出,相较刀豆脲酶的纯化而言,黑豆的 DE-52 纯化存在出峰早、杂峰较大的情况,这可能与二者的蛋白质含量与种类存在差异有关。

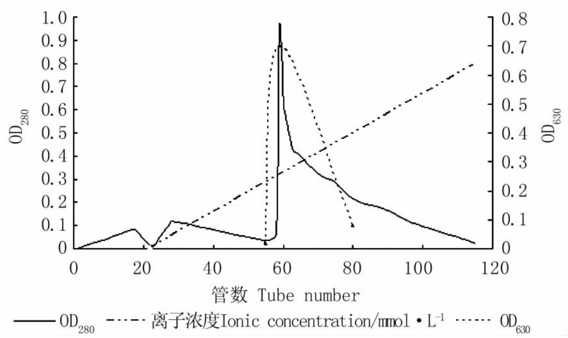

图 1 刀豆脲酶在 DE-52 纤维素柱上层析图谱

Fig. 1 Chromatography of sword bean urease on DE-52

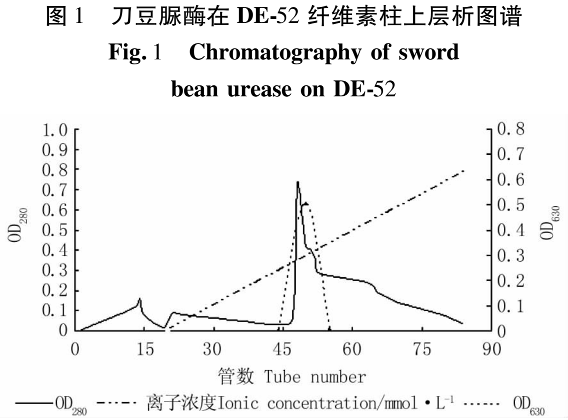

图 2 黑豆脲酶在 DE-52 纤维素柱上层析图谱

Fig. 2 Chromatography of black soybea urease on DE-52

将每一步纯化得到的蛋白质样品进行蛋白质含量与酶活的测定,计算每一步的比活力、回收率和纯化倍数(表 1)。

经各步骤纯化后,刀豆脲酶的回收率为 5.35% ,纯化倍数为 3.851;黑豆脲酶的回收率为 11.27% ,纯化倍数为 3.36。在整个纯化过程中,刀豆脲酶比活力高于黑豆,但最终回收率低于黑豆。

表 1　刀豆与黑豆脲酶的纯化

Table 1　Purification of ureases from sword bean and black soybean

试验步骤 Experimental steps	刀豆 Sword bean					黑豆 Black soybean				
	总活力 Total activity /U	总蛋白 Total protein /mg	比活力 Specific activity	纯化倍数 Purification multiple	回收率 Recovery /%	总活力 Total activity /U	总蛋白 Total protein /mg	比活力 Specific activity	纯化倍数 Purification multiple	回收率 Recovery /%
脱脂粗提液 Degrease crude extract	5357.80	378.34	14.16	1.000	100.00	370.80	53.96	6.87	1.00	100.00
冷丙酮沉淀 Precipitation with cold acetone	4640.00	212.01	21.70	1.532	86.04	121.04	14.73	8.22	1.20	32.64
硫酸铵分级沉淀 Ammonium sulfate precipitation	1661.55	43.40	38.28	2.703	31.01	99.85	5.04	19.81	2.88	26.93
DE-52 纤维素层析 Chromatographyon DE-52	286.80	5.26	54.54	3.851	5.35	41.8	1.81	23.09	3.36	11.27

2.2　反应进程曲线

脲酶催化尿素生成氨和二氧化碳或碳酸铵,黑豆脲酶在 15 min 以内、刀豆脲酶在 20 min 以内时,反应产物与反应时间基本成线性关系,曲线斜率几乎不变(图 3)。因此,后续测定脲酶的酶活性时,反应时间统一选择在 15 min 以内为基准。随着时间的延长,反应速率逐渐降低。这可能是因为底物尿素的逐渐减少,或是产物氨、二氧化碳或碳酸铵生成量的逐渐积累,减缓了酶促反应的进行,也可能是因为反应时间延长而引起酶本身部分分子的失活。

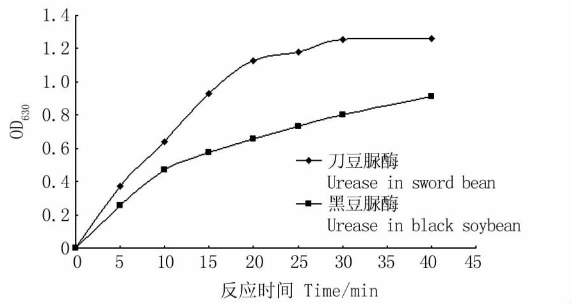

图 3　脲酶的反应进程曲线

Fig. 3　The chart of urease reaction

2.3　米氏常数 K_m

根据试验结果,用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,所得结果见图 4,K_m即为直线在 X 负轴上截距的负倒数。根据计算可得,刀豆脲酶 K_m为 1.3×10^{-2} $mol\cdot L^{-1}$,黑豆脲酶 K_m为 2.4×10^{-3} $mol\cdot L^{-1}$。可以看出,黑豆脲酶比刀豆脲酶与尿素的亲合力大。

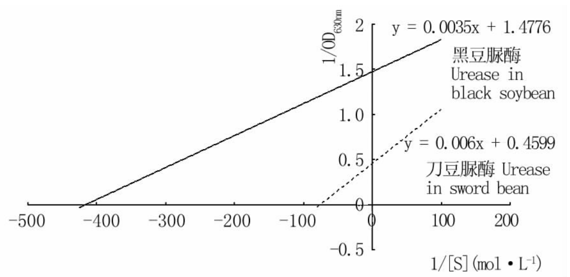

图 4　脲酶双倒数作图

Fig. 4　The kinetics of urease in Lineweaver-Burk double reciprocal plots

2.4　pH 对酶活的影响

由图 5 可以看出,刀豆和黑豆的脲酶活性均随 pH 的增加呈先增加后降低的趋势,并分别在 pH7.0 和 pH6.0 时达到活性峰值。刀豆脲酶的最适 pH 处于近中性范围内,而黑豆脲酶的最适 pH 处于酸性范围。

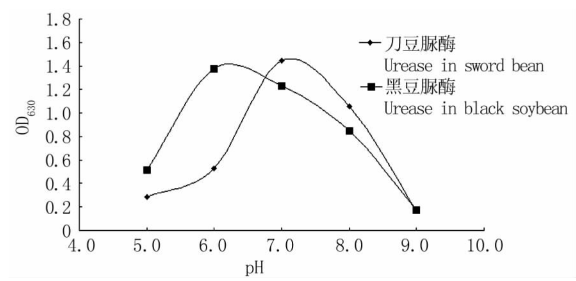

图 5　脲酶的最适 pH

Fig. 5　The optimum pH of urease

2.5　脲酶酸碱稳定性

将脲酶在不同 pH 缓冲液中于 35℃保温 1 h,再将 pH 调回 7.0 左右,按照酶活测定体系反应测定

酶活，制作酸碱稳定性曲线，发现刀豆脲酶在 pH 6.0～7.0 有较高的稳定性，而黑豆脲酶在 pH5.0～8.0 均有较高的稳定性（图6）。

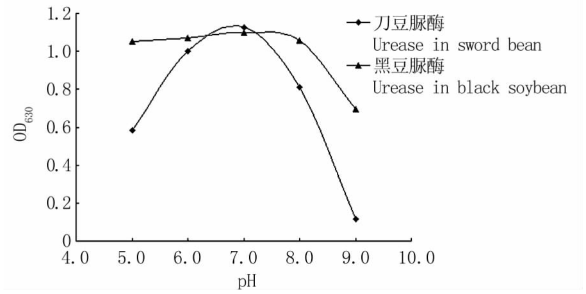

图6 脲酶的酸碱稳定性曲线

Fig. 6 The pH stability of urease

3 结论与讨论

酶的分离纯化是酶学性质研究的基础，而酶的分离纯化常以总活力的回收或比活力提高的倍数两个指标来判断分离提纯方法的优劣。本试验采用石油醚脱脂、冷丙酮沉淀、饱和硫酸铵分级沉淀、透析脱盐过夜、DE-52 阴离子交换层析等步骤分别对刀豆和黑豆中的脲酶进行了分离纯化，结果表明，经以上步骤纯化后，刀豆脲酶的回收率为 5.35%，纯化倍数为 3.851；黑豆脲酶的回收率为 11.27%，纯化倍数为 3.36。在整个纯化过程中，刀豆脲酶比活力高于黑豆，但最终的回收率低于黑豆。因此，应进一步研究刀豆与黑豆脲酶提取纯化过程中的酶活差异和回收率差异适应性，探讨黑豆取代或部分取代刀豆作为商品化脲酶产品来源的可能性，减少对进口脲酶的依赖度。

K_m是酶的一个特性常数，受底物浓度、反应温度、pH 及离子强度的影响。试验用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图，得出黑豆脲酶的 K_m 为 2.4×10^{-3} $mol\cdot L^{-1}$，与周东凯等[4]和崔有宏等[5]研究黄豆脲酶 K_m的结果基本接近。

最适 pH 是酶的特性之一，但酶的最适 pH 不是一个常数，受底物种类和浓度、缓冲液种类和浓度等许多因素的影响[1]。周东凯等研究表明，大豆脲酶的最适合 pH 为 7.0[4]；崔有宏等研究大豆脲酶最适 pH 时发现，在 EDTA-Na_2-K_2HPO_4 缓冲液中大豆脲酶最适 pH 为 6.00，在磷酸盐缓冲液中为 7.00，在 Tris-琥珀酸缓冲液中为 6.50[5]。本试验结果表明，在 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4缓冲体系中，刀豆与黑豆脲酶的最适 pH 与大豆较为接近，刀豆脲酶的最适 pH 为 7.0，处于近中性范围内；而黑豆脲酶的最适 pH 为 6.0，略偏酸性。但刀豆与黑豆酸碱稳定性差异较大，刀豆脲酶在 pH6.0～7.0 有较高的稳定性，而黑豆脲酶在 pH5.0～8.0 均有较高的稳定性，这可能与其起源和环境适应性有关。

参考文献

[1] 王镜岩，朱圣庚，徐长法. 生物化学[M]. 3 版. 北京：高等教育出版社，2002：321.（Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. Biochemistry [M]. Third ed. Beijing: Higher Education Press, 2002: 321.）

[2] 罗侃，崔有宏，王绪民，等. 黄豆脲酶波氏法尿素测定试剂盒的研制与开发[J]. 甘肃科学学报，2000，12(3)：56-60.（Luo K, Cui Y H, Wang X M, et al. Development and application of kit for determination of urea by using soy bean urease-berthelot method [J]. Journal of Gansu Science, 2000, 12(3): 56-60.）

[3] 彭虹旎，刘晨光，刘成圣，等. 脲酶固定化的研究及应用[J]. 海洋科学，2003，27(6)：38-41.（Peng H N, Liu C G, Liu C S, et al. Studies on the immobilized urease[J]. Marine Science, 2003, 27(6): 38-41.）

[4] 周东凯，刘莹，马学良，等. 大豆脲酶的提取及其影响因素研究[J]. 大豆科学，2008，27(4)：704-707.（Zhou D K, Liu Y, Ma X L, et al. Extracting of urease from soybean and its influencing factors[J]. Soybean Science, 2008, 27(4): 704-707.）

[5] 崔有宏，罗侃，吴育凌，等. 黄豆脲酶的提取与性质研究[J]. 甘肃科学学报，2000，1(1)：62-66.（Cui Y H, Luo K, Wu Y L, et al. Purification and properties of urease from *Glycine max*[J]. Journal of Gansu Science, 2000, 1(1): 62-66.）

[6] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 北京：科学出版社，2002.（Yang J X. A Course in biochemistry and molecular biology experimental technique [M]. Beijing: Science Press, 2002.）