

研究报告

龙须菜中溴过氧化物酶的分离纯化及酶学性质分析

李海燕^{1,2}, 靳艳¹, 张卫¹, 虞星炬¹, 张锦友¹, 吴佩春¹

1 中国科学院大连化学物理研究所海洋生物产品工程组, 大连 116023

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 对中国北方海域江蓠属养殖龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)进行了溴过氧化物酶分离纯化及性质的研究。粗提液中酶催化检测反应不稳定, 活力单位较低或无; 经 DEAE cellulose 52 离子交换层析, 去除了结构多糖及藻胆蛋白, 酶催化反应稳定, 得到比活力为 2.8 的电泳纯溴过氧化物酶。对纯化溴过氧化物酶性质研究表明: 该溴过氧化物酶为单体酶, 分子量约 66 kD, 溴化单氯双甲酮时的最适 pH 值为 6.0, 在 40°C 以下和 pH 3.0~9.0 之间有很好的稳定性。钒酸盐可提高该溴过氧化物酶的催化活性, 而 Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 和 EDTA 等化合物对其有较显著的抑制作用。反应动力学实验表明, 该酶对 Br⁻、H₂O₂ 的 K_m 分别为 53.5 μmol/L 和 38 μmol/L。

关键词: 龙须菜, 溴过氧化物酶, 分离纯化, 性质

Purification and Characterization of a Bromoperoxidase from *Gracilaria lemaneiformis*

Haiyan Li^{1,2}, Yan Jin¹, Wei Zhang¹, Xingju Yu¹, Jinyou Zhang¹, and Peichun Wu¹

1 Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: A bromoperoxidase from *Gracilaria lemaneiformis* was purified to homogeneity using a multi-step process of ammonium sulfate precipitation (AS), dialysis, and DEAE-cellulose 52 anion exchange chromatography. The bromoperoxidase activity was unstable or undetectable in crude extract solution. However, it became stable with electrophoretic purity after this multiple purification process. The anion exchange chromatography purification was a critical step in the purification process, which effectively eliminated the phycobiliprotein and smucilaginous polysaccharides. The purified bromoperoxidase was a monomeric enzyme with the relative molecular masses of 66 kD as determined by denaturing and native gradient gel electrophoresis. The optimal pH for bromination was 6.0 and bromoperoxidase activity was stable as stored at a broad pH range of 3.0~9.0. Of a range of compounds tested, only vanadium enhanced bromoperoxidase activity. Kinetic studies for the bromination of monochlorodimedone (MCD) showed that the K_m values of Br⁻ and H₂O₂ are 53.5 μmol/L, 38 μmol/L respectively.

Keywords: *Gracilaria lemaneiformis*, bromoperoxidase, purification, characterization

Received: September, 2007; **Accepted:** November 15, 2007

Supported by: the National Key Basic R&D Project '973'(No. 2003CB716001) and the Innovative Key Project of the Chinese Academy of Sciences (No. KZCX2-YW-209).

Corresponding author: Wei Zhang. Tel: +86-411-84379069; Email: WeiZhang@dicp.ac.cn

国家“973项目”(No. 2003CB716001)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KZCX2-YW-209)资助。

海洋天然产物中存在大量的卤素有机化合物, 具有抗菌、抗肿瘤等特殊的生理活性^[1]。卤素过氧化物酶是至今唯一被广泛接受、与有机卤化物生物合成相关的酶^[2], 可使很多有机物卤化形成具有生理活性的卤素有机物, 还具有催化硫氧化、环氧化、吲哚氧化及其它反应的作用, 因此卤素过氧化物酶在药物合成和高附加值化合物合成方面越来越引起重视^[1,2]。

溴过氧化物酶普遍存在于海藻中, 尤其以红藻居多^[3], 国内外对珊瑚藻(*Corallina officinalis*)溴过氧化物酶的研究较多^[3-7]。珊瑚藻生长季节性很强, 采集量少, 成为溴过氧化物酶开发利用的瓶颈。龙须菜作为江蓠属的一个特有种, 因适应性快、生长率高等优点, 已成为中国产量第三的养殖大型海藻^[8]。江蓠属红藻含有丰富的多糖(藻体干重的 30%~70%)及藻胆蛋白(可溶性蛋白的 60%), 其存在影响各种酶的催化检测反应, 增加了酶分离纯化的难度, 这是红藻生理功能蛋白研究较少的主要原因^[9]。本文首次报道了我国北方养殖龙须菜中酶蛋白的研究, 利用硫酸铵沉淀及 DE-52 离子交换层析成功将多糖及色素蛋白去除, 实现了溴过氧化物酶的分离纯化, 并研究了该酶的理化性质。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

龙须菜样品 2006 年 10 月采集于大连长海县(122°35'E; 39°17'N)低潮养殖区。清洗, 去除岩石碎片及附生植物, 置-70℃冰箱中保存备用。

单氯双甲酮(MCD), Folin-酚, 丙烯酰胺, 双丙烯酰胺, 四甲基己二胺, 十二烷基磺酸钠, 牛血清白蛋白均为 Sigma 公司产品, Tris 碱为 Amresco 公司; DEAE-Cellulose 52 为 Whatman 公司产品; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 粗提液的制备

200 克湿藻, 液氮研磨, 150 mL 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.3) 4℃, 浸泡 48 h, 纱布过滤。4℃, 6500 g 离心 20 min, 上清液即为粗提液。

1.2.2 硫酸铵分级沉淀

粗提液加固体硫酸铵至饱和度 30%, 4℃, 搅拌 4 h, 10 000 g 离心 20 min。弃沉淀, 上清 60%硫酸铵

沉淀, 4℃, 搅拌 4 h, 10 000 g 离心 20 min。收集沉淀, 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.3)透析过夜。

1.2.3 DEAE-cellulose 52 离子交换层析

50 mmol/L pH8.3 Tris-HCl 缓冲液平衡 3 个柱体积后, 酶液样品上 DEAE-cellulose 52 柱(2.6 cm × 25 cm), NaCl 浓度从 0.1~0.5 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.3)线性梯度洗脱, 每分钟约 1 mL, 每管收集时间为 5 min。测定每管收集液的酶活及 280 nm 处的吸光值。合并有酶活的组分。冷冻干燥浓缩, 透析过夜。取少量粗提液、硫酸铵沉淀后的酶液及离子交换层析后的酶液, 测定蛋白含量和酶活性。

1.2.4 Sephacryl-S300 分子筛层析

50 mmol/L pH8.3 Tris-HCl 缓冲液平衡 3 个柱体积, 部分酶液上 Sephacryl-S300 柱(1.6 cm × 75 cm), 含 0.1 mol/L NaCl 的 50 mmol/L pH 8.3 Tris-HCl 洗脱液洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 每管收集时间为 6 min, 收集有酶活的组分, 待测分子量。

1.2.5 溴过氧化物酶活性的测定

参照文献^[7], 3 mL 的反应体系, 底物单氯双甲酮(MCD)、KBr、H₂O₂ 的浓度分别为 50 μmol/L、2 mmol/L、2 mmol/L, pH 为 6.0, 在室温下于 290 nm(单氯双甲酮的紫外吸收峰)测定吸光值的变化, 以每分钟消耗 1 μmol/L 单氯双甲酮所需的酶量定义为一个溴过氧化物酶活力单位。

1.2.6 藻红蛋白纯度的测定

分别检测藻红蛋白最大可见吸收峰 565 nm 的吸光值及蛋白质特征吸收峰 280 nm 下的吸光值, 参考文献^[11](OD₅₆₅/OD₂₈₀), 计算样品的藻红蛋白纯度。

1.2.7 蛋白含量的测定

采用 Lowry 检测法^[12]。

1.2.8 溴过氧化物酶分子量的确定

采用 5%~30%连续非变性凝胶电泳测定全酶分子量; 采用不连续 SDS 变性凝胶电泳测定表观分子量^[12]。标准蛋白分别为高分子量 Marker 及低分子量 Marker。

2 结果和分析

2.1 溴过氧化物酶的分离纯化

龙须菜粗酶液依次经过硫酸铵分级沉淀及 DEAE-cellulose 52 离子交换层析等步骤, 各组分分别用 280 nm 吸光度法和 MCD 法检测蛋白含量和溴

过氧化物酶活性。图 1 是经 DE-52 柱层析后的色谱图, 经柱分离后, 溴过氧化物酶分布于总蛋白洗脱峰的峰尾, 与藻红蛋白彻底分离, 说明该酶是酸性蛋白, 等电点较低。表 1 是经各纯化步骤后溴过氧化物酶活性的变化: 龙须菜中含有丰富的结构多糖和藻胆蛋白, 影响了粗提液中溴过氧化物酶的活力检测, 酶活反应不稳定或检测不到; 硫酸铵沉淀后的酶液, 酶活反应稳定, 比活力较低; 经 DEAE-cellulose 52 离子交换层析柱纯化, 总酶活提高到 60 u, 得到比活力为 2.8 的电泳纯溴过氧化物酶, 以该组分为对象进行溴过氧化物酶性质的研究。

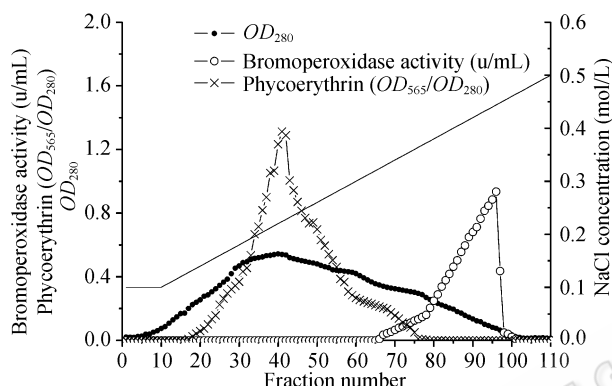


图 1 DE-52 层析洗脱谱图

Fig. 1 Chromatographic profile of crude protein extracts from *G. lemaneiformis* on DEAE-cellulose 52 column

表 1 龙须菜中溴过氧化物酶的纯化

Table 1 Purification of bromoperoxidase from *G. lemaneiformis*

Step	Total protein/mg	Detectable total activity/u	Specific activity/(u/mg)
Crude enzyme Solution	1282.5	0	0
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	304.6	7	0.02
DEAE-cellulose 52	21.4	60	2.80

2.2 溴过氧化物酶性质

2.2.1 溴过氧化物酶分子量

经 DEAE-cellulose 和 DEAE-cellulose + Sephacryl 层析的溴过氧化物酶, SDS-PAGE 电泳谱图相似, 见图 2(a), 深浅两条电泳带, 其分子量分别约为 120 kD、66 kD。Almeida^[14,15]等指出, 在 SDS 存在条件下, 红藻中分离纯化的过氧化物酶易于聚集成多聚体, 深的酶条带可能是溴过氧化物单体酶的聚集体, 浅的酶条带是其表观分子量。5%~30%连续非变性聚

丙烯酰胺凝胶电泳谱图见图 2(b), 该溴过氧化物酶全酶分子量约为 60 kD。溴过氧化物酶一般由一个或几个相对分子量约为 65 kD 亚基组成, 且为酸性蛋白(pI: 4~5)^[13], 因此推论龙须菜中分离得到的溴过氧化物酶为单体酶, 分子量约 66 kD。

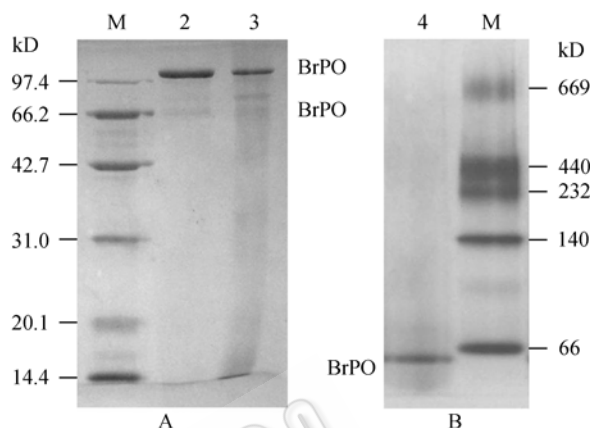


图 2 溴过氧化物酶 PAGE 电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of purified bromoperoxidase
A: SDS-slab gel; B: 5%~30% gradient gel
M: protein marker; 2: BrPO after DEAE-cellulose + Sephacryl;
3, 4: BrPO after DEAE-cellulose

2.2.2 溴过氧化物酶最适反应 pH

pH 值是影响酶活的主要参数之一, 在 pH 4.0~9.0 的范围内进行溴过氧化物酶催化单氯二甲酮反应, 考察溴过氧化物酶催化反应的最适 pH 范围。pH 系统为: pH 4.0~5.0, NaAc-Hac; pH 6.0~10.0, Tris-HCl, 其它条件不变。以酶活最高值为 100%, 对不同 pH 作图, 结果见图 3。由图可见酶的最适 pH 值为 6.0, pH 值在 5.0~7.0 的范围内溴过氧化物酶的酶活均可达到最高酶活的 50%以上, 超出该范围酶活急剧下降。

2.2.3 溴过氧化物酶在不同 pH 下的稳定性

酶在不同 pH 环境下的稳定性是酶应用的重要指标。将纯化的酶液与 pH 3.0~10.0 的缓冲体系相混合(缓冲体系同上), 4°C 放置 24 h、72 h 后, 取适量酶液在最佳反应条件 pH 6.0 时测定酶活。以酶活最高值为 100%, 对不同 pH 作图, 结果见图 4。该溴过氧化物酶在所测 pH 范围内能较好地保持其酶活; 72 h 孵育后, 酶活降低, 但仍在最高酶活的 50%以上; pH 4.0 及 pH 5.0 时, 酶活最稳定。该溴过氧化物酶在较宽的 pH 范围内, 较长的时间内, 均可保持较高的活性, 利于其在有机合成等方面的应用。

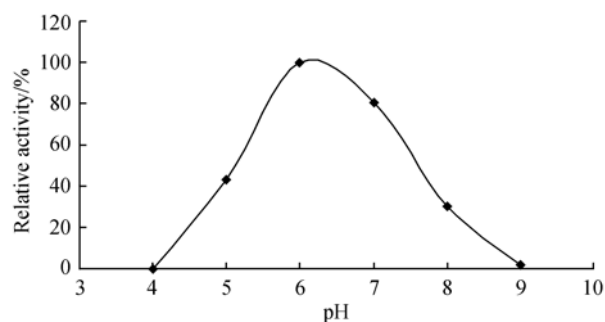


图3 pH对溴过氧化物酶活性的影响
Fig. 3 pH optimum of bromoperoxidase

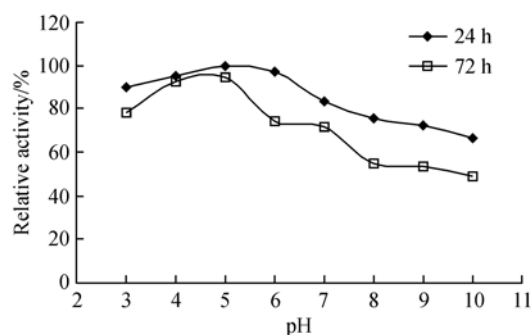


图4 不同pH值下溴过氧化物酶的储存稳定性
Fig. 4 Effect of pH on the storage stability of bromoperoxidase at 4°C

2.2.4 溴过氧化物酶热稳定性

酶液在4~80°C温度下分别孵育10 min、30 min、60 min后,测定活性。4°C的酶活力为100%,不同孵育条件下酶的相对活性见图5。常温下,溴过氧化物酶活性稳定;40°C时10 min酶活保持在80%以上,30 min以后酶活降低到原来的70%以下;随着温度的升高,反应时间的延长,酶活力逐渐降低,温度至70°C时,酶完全失活。

2.2.5 酶反应动力学性质

图6是利用Lineweaver-Burk双倒数图计算溴化钾和过氧化氢的米氏常数 K_m ,溴离子的 $K_m=53.5 \mu\text{mol/L}$;过氧化氢的 $K_m=38 \mu\text{mol/L}$ 。

2.2.6 化合物对溴过氧化物酶酶活性的影响

分别考察各种化合物对溴过氧化物酶活力的变化。以不添加化合物时的酶活为100%,结果见表2。只有钒酸盐使溴过氧化物酶的活性提高,其它化合物均使酶活略有下降,其中, Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和EDTA等对其有较显著的抑制作用。

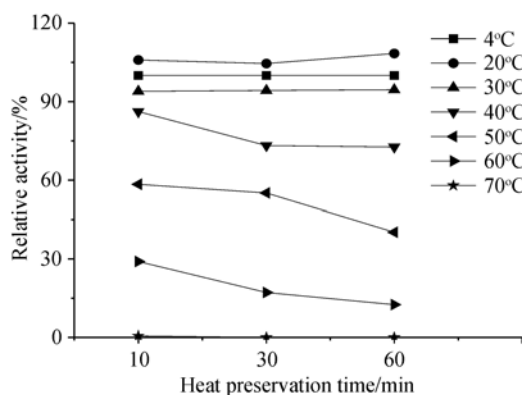


图5 溴过氧化物酶的热稳定性
Fig. 5 Effect of temperature on stability of bromoperoxidase

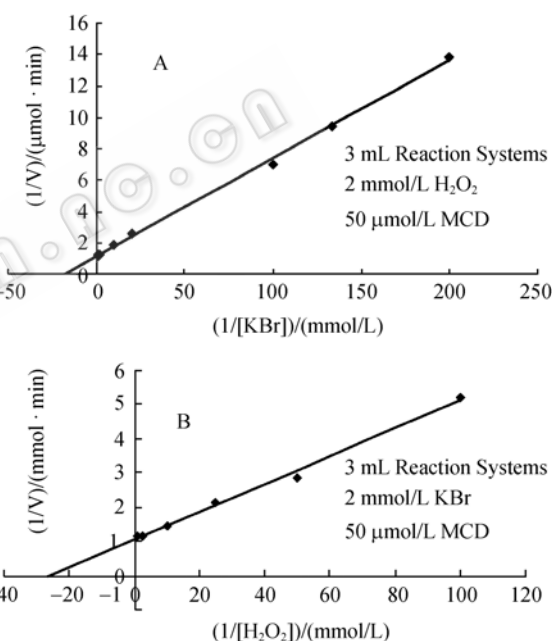


图6 溴过氧化物酶催化单氯双甲酮的Lineweaver-Burk双倒数图

Fig. 6 Lineweaver-burk plot for the bromination of monochlorodimedone catalyzed by the bromoperoxidase
A: KBr; B: H_2O_2

3 讨论

本研究从大连海域养殖龙须菜中发现了溴过氧化物酶活性,这是关于养殖龙须菜酶蛋白研究的首次报道。龙须菜中丰富的结构多糖及藻胆蛋白,影响了溴过氧化物酶的活性检测。利用离子交换层析成功将多糖及色素蛋白去除,解除了酶的抑制作用,实现了溴过氧化物酶的分离纯化,成为纯化溴过氧

化物酶的关键步骤。本实验龙须菜中溴过氧化物酶的含量(0.3 u/g 湿藻)与 Moore & Okuda^[6]报道的来自美国野生龙须菜(*Gracilaria sjoestedtii*)的溴过氧化物酶含量(21 u/g 湿藻)相比较低,可能与不同品种,不同生长方式,不同季节,不同地域生长条件的差异等因素相关。天然海藻中溴过氧化物酶的主要生理功能是合成含有卤素的化合物,是对敌害生物的一种防御作用。本实验所用原料为外殖体养殖龙须菜,含胶量丰富,养殖环境单一,合成卤化有机物的能力可能有所降低,下一步的试验有待将几种不同来源和采收季节的龙须菜进行对比研究,发现有利于产溴过氧化物酶的最佳品种和养殖条件。

表 2 不同化合物对溴过氧化物酶活性的影响
Table 2 Effect of different compounds on the activity of bromoperoxidase

Compounds	Relative activity/%
Na ₃ VO ₄	122
EDTA	72
MnSO ₄	87
MgSO ₄	89
CaCl ₂	99
Co(NO ₃) ₂	97
NaF	92
CuSO ₄	51
ZnSO ₄	79
FeSO ₄	79
FeCl ₃	72

龙须菜溴过氧化物酶,与文献报道的酶^[4,14,15]在性质上基本相同:单体酶,分子量约 66 kD;最佳 pH 为 6.0;最佳温度为室温;钒可以增强溴过氧化物酶活性,推测是钒-溴过氧化物酶。钒-溴过氧化物酶在有机合成中除了能够催化加卤反应外还具有催化氧化等反应性能^[1,2,4],在有机合成中的应用非常广泛。温度及 pH 环境是影响化学反应速度的关键因素,大连海域养殖龙须菜中得到的溴过氧化物酶具有较宽的 pH 耐受性,室温时活性最高,且养殖龙须菜原料易得,可降低工业生物催化成本,具备成为工业生物催化剂的潜力,研究开发其工业应用价值具有重要的科学意义和实际应用价值。

REFERENCES

[1] Dembitsky VM. Oxidation, epoxidation and sulfoxidation

reactions catalysed by haloperoxidases. *Tetrahedron*, 2003, **59**: 4701–4720.

- [2] Andersson M, Willetts A, Allenmark S. Asymmetric sulfoxidation catalyzed by a vanadium-containing bromoperoxidase. *Journal of Organic Chemistry*, 1997, **62**: 8455–8458.
- [3] Bulter A, Carter-Franlin JN. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. *Nature Products Reports*, 2004, **21**: 180–188.
- [4] Bulter A. Vanadium haloperoxidases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1998, **2**: 279–285.
- [5] Itoh N, Sasaki H, Ohsawa N, *et al.* Bromoperoxidase in *Corallina pilulifera* is regulated by its vandate content. *Phytochemistry*, 1996, **42**: 277–281.
- [6] Moore CA, Okuda RK. Bromoperoxidase activity in 94 species of marine algae. *Journal of Natural Toxins*, 1996, **5**: 295–305.
- [7] Itoh N, Izumi Y, Yamada H. Characterization of nonheme type bromoperoxidase in *Corallina pilulifera*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, **261**: 5194–5200.
- [8] Zhou Y, Yang HS, Hu HY. Bioremediation potential of the macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) integrated into fed fish culture in coastal waters of north China. *Aquaculture*, 2006, **252**: 264–276.
- [9] Koji L, Yoshihiro S. Technical improvement in the purification of enzymes from red algae using an aqueous two-phase partitioning system. *Phycological Research*, 2005, **53**: 164–168.
- [10] Niu JF, Wang GC, Tseng CK. Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. *Protein Expression and Purification*, 2006, **49**: 23–31.
- [11] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 1951, **193**: 265–275.
- [12] Wang JZ, Fan M. Protein technical manual. Beijing: Science Press of China, 2000, 77–124.
汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 科学出版社, 2000, 77–124.
- [13] Almeida MG, Huamnes M, Melo R, *et al.* Purification and characterization of vanadium haloperoxidases from the brown alga *Pelvetia canaliculata*. *Phytochemistry*, 2000, **54**: 5–11.
- [14] Almeida MG, Filipe S, Huamnes M, *et al.* Vanadium haloperoxidase from brown algae of the Laminariaceae family. *Phytochemistry*, 2001, **57**: 633–642.
- [15] Jin Y, Zhang JY, Wu PC, *et al.* Bromoperoxidase activity in three species of marine algae and the characterization of vanadium bromoperoxidase from *Corallina officinalis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, **14**: 482–487.
靳艳, 张锦友, 吴佩春, 等. 几种海藻中溴过氧化物酶的筛选及酶学性质. 中国水产科学, 2007, **14**: 482–487.