

文章编号: 1004-7271(2001)02-0154-04

## 乌贼墨中多酚氧化酶的分离及纯化

郑校先, 戚晓玉, 周培根, 江津津

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

**摘要:**用 pH 7.2 磷酸提取缓冲液从乌贼墨汁中提取多酚氧化酶。提取的粗酶液经 30% ~ 80% 饱和度硫酸铵分级沉淀、透析、DEAE-Sephrose CL-6B 柱层析和 Sephadex G-150 柱层析后, 得到纯化的多酚氧化酶, 纯化倍数为 10.78。纯化后的酶液经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分别采用银染色和多酚氧化酶活性染色均显示一条电泳带。

**关键词:**乌贼墨; 多酚氧化酶; 纯化

**中图分类号:** S985.9      **文献标识码:** A

## Purification of polyphenol oxidase from cuttlefish ink

ZHENG Xiao-xian, QI Xiao-yu, ZHOU Bei-gen, JIANG Jin-jin

(College of Food Science, SFU, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Polyphenol oxidase (PPO) was extracted from the cuttlefish ink with pH 7.2 sodium phosphate extraction buffer. The crude enzyme extract was fractionated with solid ammonium sulfate of 30% - 80% saturation. After dialysis, the enzyme solution was purified by DEAE-Sephrose CL-6B column chromatography and Sephadex G-150 column chromatography respectively. A 10.78 fold purification of PPO was obtained. The result from polyacrylamide gel electrophoresis of purified enzyme indicated that only one band was found using silver stain and PPO activity stain, respectively.

**Key words:** cuttlefish ink; Polyphenol oxidase; purification

多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, 简称 PPO, E. C. 1.10.1.1)分布很广, 在微生物、植物、动物和人类都有存在。研究发现该酶是生物体合成黑色素的关键酶<sup>[1]</sup>。自从科学家证实乌贼墨含有抗糖物质以后, 它已成为日本开发生产保健食品的主要原料之一<sup>[2]</sup>。国外有学者从乌贼墨检测到酪氨酸酶的活性<sup>[3]</sup>, 但是, 对乌贼墨黑色素形成机理的研究尚未见报道。本文主要目的是从乌贼墨中分离纯化 PPO, 从而为研究乌贼墨 PPO 特性以及墨汁黑色素形成机理提供高纯度的酶液。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料

新鲜的乌贼购自上海当地市场, 大小均匀, 带回实验室后迅速取其墨囊中墨汁, 于 4℃ 下贮藏。

## 1.2 PPO的提取及纯化

### 1.2.1 PPO的提取

PPO的提取主要参考Chen等<sup>[4]</sup>的方法,并略作修改。取乌贼墨粉30g,加预先冷却的150mL 0.05 mol/L, pH 7.2磷酸盐提取缓冲液(内含NaCl浓度为1.0mol/L和0.2% Brij35)。在4℃下温和搅拌提取1h。然后将提取液于20 000 g离心30min,取上清液作为粗酶液。

### 1.2.2 硫酸铵沉淀

加入固体硫酸铵粉末到粗酶液中,使其饱和度达到30%,静置30min后,于20 000 g离心30min,取上清液,然后再加入固体硫酸铵粉末使其饱和度达到80%,静置30min后,于20 000 g离心30min,收集沉淀。再将其溶解在少量体积的0.05 mol/L, pH 7.2的磷酸钠缓冲液后,以该缓冲液为透析液,透析过夜,其间更换3次透析液。

### 1.2.3 DEAE-Sephrose CL6B柱层析

经透析的酶液采用DEAE-Sephrose CL-6B柱层析纯化<sup>[5]</sup>。上样后,先用500mL含0~1.0 mol/L NaCl的0.05 mol/L, pH 7.2的磷酸钠缓冲液进行梯度洗脱,然后用含1.0 mol/L NaCl的0.05 mol/L, pH 7.2的磷酸钠缓冲液洗脱,流速为0.3mL/min,每6.8mL收集一管。以0.05 mol/L, pH 7.2的磷酸钠缓冲液为对照,于波长280nm处测定各管洗脱液的吸光度值。以A280为纵坐标,洗脱液管号为横坐标,作出蛋白质洗脱曲线;以每管PPO活性为纵坐标,洗脱液管号为横坐标,作出PPO洗脱曲线。最后将含有高PPO活性的各管洗脱液合并,按前面所述的方法进行透析。

### 1.2.4 Sephadex G-150柱层析

上述透析后的酶液通过Sephadex G-150葡聚糖凝胶柱,用0.05 mol/L, pH 7.2的磷酸钠缓冲液进行洗脱,流速为0.18mL/min,每5mL收集一管。按上述方法分别作出蛋白质和PPO洗脱曲线。以上PPO提取及纯化步骤均在4℃下进行。

## 1.2 PPO纯度的电泳鉴定

纯化后酶液的纯度用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进行鉴定。凝胶浓度为7%,电极缓冲液为0.05 mol/L, pH 7.2的磷酸钠缓冲液,起始电流为5mA,待样品出样品槽后,加大电流至30mA,电泳9~10h。分别采用银染色<sup>[6]</sup>和PPO活性染色<sup>[4]</sup>两种方法检测蛋白质和酶带。

## 1.4 PPO活力及蛋白质测定

以0.05 mol/L, pH 6.5磷酸钠缓冲液配成5 mmol/L的多巴溶液为底物。取2.98mL底物溶液30℃保温3min后,迅速加入0.02mL酶液,混匀,在波长475nm处测其吸光度每分钟的变化。在上述条件下,使吸光度值每分钟增加0.001所需要的酶量为一个酶活力单位<sup>[7,8]</sup>。

蛋白质含量的测定方法参考Hartree法<sup>[9]</sup>。标准蛋白为牛血清白蛋白(BSA)。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 PPO的稳定性

图1表示粗酶液的PPO活性与时间的关系曲线。结果表明,4℃下,该酶在0.05mol/L pH7.2的磷酸钠缓冲液系统中一周内表现出极高的稳定性,而且酶活性在贮藏的6d内略有增加。这一现象可能是该酶液中存在有少量的PPO酶原,受到激活所致<sup>[10]</sup>。

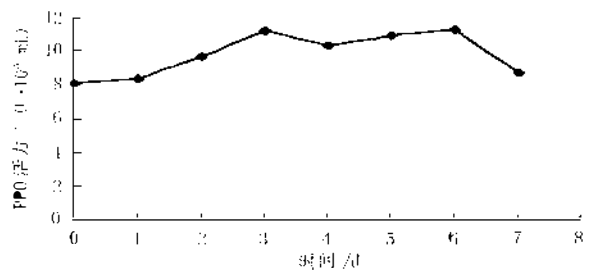


图1 在4℃下PPO稳定性  
Fig.1 The stability of PPO at 4℃

### 2.2 PPO的提取及纯化

由表1可见,粗酶经30%~80%饱和度硫酸铵分级沉淀后,去除了50.7%的杂蛋白,酶活力回收率

高达 126.59%，比活力比粗酶液提高了 2.57 倍。在提取虾类 PPO 的过程中也有酶活性增加的现象<sup>[6]</sup>，原因可能是在提取过程中去除了 一些 PPO 抑制物质而造成的。

表 1 乌贼墨 PPO 纯化结果

Tab.1 Purification of the cuttlefish ink PPO

纯化步骤	体积 (mL)	活力 (U/mL)	蛋白含量 (mg/mL)	比活力 (U/mg)	产率 (%)	纯化倍数
粗 酶	97	3146.7	1.25	2518.97	100	1
30% ~ 80% 的硫酸铵沉淀	14	2760.0	4.27	6470.06	126.59	2.57
DEAE-Sepharse CL-6B	21	12544.6	0.76	16506.02	86.31	6.55
Sephadex G-150	26	7062.7	0.26	27164.35	60.16	10.78

经硫酸铵沉淀后的 PPO 采用 DEAE-Sepharse CL-6B 柱层析进一步纯化,并选用改变洗脱液离子强度的方法对 PPO 进行梯度洗脱,NaCl 的梯度为 0 ~ 1.0mol/L。从图 2 可以看出,通过此层析柱,杂蛋白和酶得到了有效的分离。根据洗脱曲线,将对应于第一个洗脱峰的第 29 ~ 31 管洗脱液合并,经测定蛋白质浓度为 6.30mg/mL,没有检测到 PPO 活力。将对应于第二个洗脱峰的第 43 ~ 45 管洗脱液合并,蛋白质浓度为 0.76mg/mL,酶活力为 12 544.6 U/mL,比活力为 16 506.02 U/mg,对应的 NaCl 浓度大约为 0.6mol/L。经过此纯化步骤,酶液的比活力比粗酶液提高了 6.55 倍。

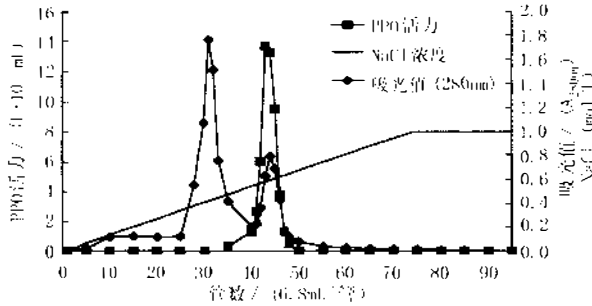


图 2 PPO 的 DEAE-Sepharse CL-6B 柱层析洗脱曲线  
Fig.2 Elution profile of PPO from DEAE-Sepharse CL-6B column

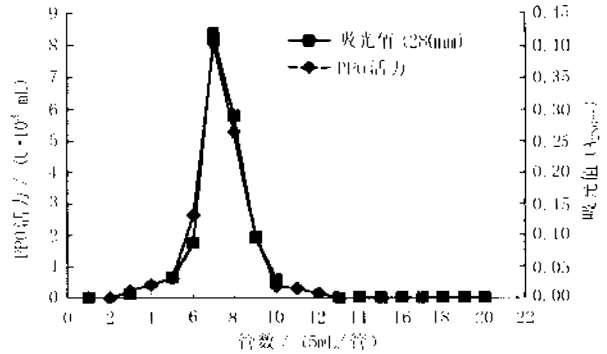


图 3 PPO 的 Sephadex CL-150 柱层析洗脱曲线  
Fig.3 Elution profile of PPO from Sephadex CL-150 column

上述 DEAE-Sepharse CL-6B 柱层析后的酶液透析后,经过 Sephadex G-150 葡聚糖凝胶柱层析进一步纯化,洗脱曲线如图 3 所示。将对应于洗脱峰的第 7 ~ 8 管洗脱液合并,蛋白质含量为 0.26mg/mL,酶活力为 7 062.73 U/mL,比活力为 27 164.35 U/mg,经过此纯化步骤,酶液的比活力比粗酶液提高了 10.78 倍。在上述整个纯化过程中,酶活力的回收率高达 60.16%,同时杂蛋白去除率为 94.42%。

2.3 PPO 纯度的电泳鉴定

PPO 聚丙烯酰胺凝胶水平板电泳结果见图 4。A 代表银染色,B 代表以邻苯二酚为底物的 PPO 活性染色。由图 4 可见,采用银染色和活性染色都只

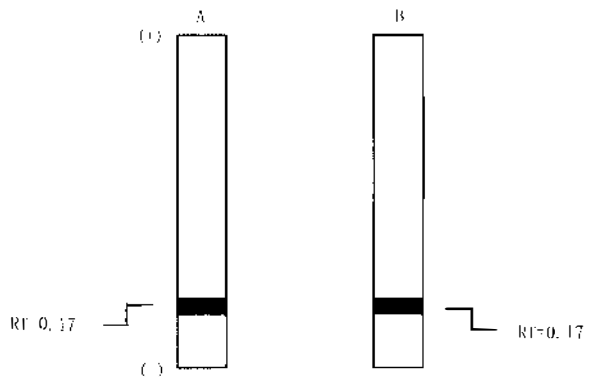


图 4 PPO 纯度的聚丙烯酰胺电泳图谱  
Fig.4 PAGE pattern of purified PPO (A: 银染色的纯化酶液电泳图;B: 邻苯二酚为底物活性染色的纯化酶液电泳图)

检测到一条电泳带的存在,且它们的迁移率(Rf)是完全一样的,均为0.17,这说明酶液已经达到很高的纯度。

### 参考文献:

- [1] Jeffrey D L, Linda A P. Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma[J]. J Biochem. 1986, 261: 166-170.
- [2] 王杏珠. 日本乌贼墨的开发和利用[J]. 海洋信息, 1995, 12: 15.
- [3] Hajime M, Takaya Y, Uchisawa H, et al. Antitumor peptidoglycan with new carbohydrate structure from squid ink[C]. Conference: CA Section: 1(Pharmacology)Section cross-reference(s). 1997, 12: 331-336.
- [4] Chen J S, Rolle R S, Marshall M R, et al. Comparison of phenoloxidase activity from florida spiny lobster and western Australian lobster[J]. Journal of Food Science, 1991, 56(1): 154-157.
- [5] Shaw J F, Chu H L, Pan B S. Purification of isozymes of bighead shrimp tyrosinase[J]. Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society. 1989, 27(3): 350-359.
- [6] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 88-91.
- [7] 赵 娇, 戚晓玉, 尤瑜敏, 等. 日本对虾的酚氧化酶特性研究[J]. 上海水产大学学报, 1997, 6(3): 157-165.
- [8] Zhou P G, Smith N L, Lee C Y. Potential purification and some properties of monore apple peel polyphenol oxidase[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1993, 41(4): 1892-1895.
- [9] Hartree E F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response[J]. Analytical Biochemistry, 1972, 48: 422-427.
- [10] Espin J C, Leeuwen J V, Wichers H J. Kinetic study of the activation process of a latent Mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1999, 47(9): 3509-3517.