

# 草菇蛋白酶的分离、纯化及等电点的测定\*

李世贵<sup>1</sup> 陈明杰<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081; <sup>2</sup> 上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201106)

**摘要:** 草菇是我国食用菌主要栽培品种之一, 属典型高温真菌。低温将诱导草菇细胞内的蛋白质降解, 导致草菇菌丝自溶、死亡。蛋白酶在草菇低温自溶过程中起了重要作用。在分离、纯化草菇蛋白酶的基础上, 采用等电点聚焦电泳测定了蛋白酶的等电点, 为草菇低温自溶与蛋白酶之间的研究奠定了基础。

**关键词:** 草菇, 蛋白酶, 等电点, 低温, 自溶

**中图分类号:** Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-3515 (2003) 02-0335-0338

草菇 *Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) Sing. 是一种高温型食用菌, 对温度变化敏感, 常规低温 (0~5℃) 会发生自溶, 这严重制约了其开发利用。草菇低温应答研究还处于开始阶段, 低温下的生理生化变化机制和代谢途径至今还未完全明了。陈明杰等 (1995) 采用凝胶电泳技术测定 4℃ 低温处理 24 小时的草菇菌丝体内的蛋白质分子的变化, 研究发现, 与正常温度下生长的菌丝体相比, 低温处理的草菇菌丝体内的大分子蛋白质减少, 小分子蛋白质增加, 蛋白质发生了降解。据此推断草菇菌丝体内的蛋白酶在草菇低温自溶过程中起了重要的作用。本实验在分离、纯化草菇子实体内蛋白酶的基础上, 采用等电点聚焦电泳测定了蛋白酶的等电点, 为草菇低温下的生理生化变化机制和代谢途径的研究奠定了基础, 为草菇低温保鲜研究提供了理论依据。

## 1 实验材料

### 1.1 供试草菇菌种

草菇 V23 采自上海草菇产地南汇县, 经低温 4℃ 处理 24h 后, 于 -70℃ 低温保存。

### 1.2 主要试剂及配制方法

**1.2.1 聚丙烯酰胺贮液:** 丙烯酰胺, 29.2 克; N,N-二甲基丙烯酰胺, 0.8 克; 用蒸馏水溶解, 并定容至 100mL 后, 经滤纸过滤, 4℃ 保存。

**1.2.2 凝胶固定液:** 12 克三氯乙酸, 加蒸馏水定容至 100mL。

**1.2.3 凝胶染色液:** 0.1 克考马斯亮蓝 R250, 35mL 乙醇, 10mL 冰醋酸, 用蒸馏水定容至 100mL。

**1.2.4 凝胶脱色液:** 125mL 乙醇, 50mL 冰醋酸, 用蒸馏水定容至 500mL。

## 2 实验方法

### 2.1 草菇蛋白酶的分离、纯化

**2.1.1 粗酶液的制备:** 草菇子实体经破碎、硫酸铵分步沉淀、透析、冷冻干燥浓缩、Dextran G-150

\*收原稿日期: 2002-03-29, 收修改稿日期: 2002-04-24

凝胶过滤进一步纯化（李世贵等，2000）。经凝胶过滤后，共收集 32 管洗脱液，每管 1.5mL。用 DU640 型紫外分光光度仪测定各管洗脱液在 280nm 处的紫外吸光光度值，并将处于同一吸收峰的洗脱液收集在一起，分别称为 A 组份、B 组份、C 组份。

**2.1.2 蛋白酶活性的测定：**以牛血清白蛋白（BSA）为作用底物，在室温下与酶液反应一段时间后，加入三氯乙酸（TCA）以终止酶反应，然后再加入 Bradford 试剂与蛋白质结合，产生蓝色结合物，用 756MC 型分光光度仪测定其在 595nm 处的吸光光度值。蓝色的深浅与溶液中残余 BSA 的量成正比，根据反应前后吸光光度值的变化推测该酶液是否具有蛋白酶活性（王重庆等，1994）。具体步骤见表 1，每个样品作 3 个重复取平均值，与其对照进行比较。

表 1 蛋白酶样品活性的测定方法

Table 1 The assay method of the activity of proteinase sample

试剂 Reagent	管号 Tube No.		
	空白	D 样	D 对
酶液 (μL)	0	100	100
0.4mol/L TCA (μL)	200	0	200
5ug/μL BSA (μL)	0	20	20
		室温下作用 15min	
0.4mol/L TCA (μL)	0	200	0
		室温下作用 20min	
Bradford 原液(mL)	1	1	1
蒸馏水(mL)	4.12	4	4

混匀，用 756MC 型分光光度仪测定其在 595nm 处的吸光光度值。

**2.1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白酶样品的纯度：**取具有蛋白酶活性的样品以浓缩胶 T%=4%，C%=2.67%；分离胶 T%=10%，C%=2.67%，进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其纯度（李世贵等，2000）。

2.2 草菇蛋白酶的等电点聚焦电泳

**2.2.1 制胶：**本实验采用 Pharmacia 的制胶模具，溶液的配方见表 2。

**2.2.2 等电点聚焦电泳：**采用瑞典 Pharmacia LKB 公司的多用电泳仪进行。分别用 1mol/L 的磷酸和 1mol/L 的氢氧化钠作阳、阴两极的电极溶液，用牛血红蛋白作标记蛋白。电参数设置为：电压 1500v、电流 15mA、电功率 8w。预电泳 30 分钟，再加样。电泳半小时后，去掉加样滤纸，继续电泳 2 小时，停止电泳（郭尧君，1999）。

**2.2.3 固定、染色、脱色：**电泳结束后，弃去滤纸电极条，立即将凝胶浸泡在固定液中 45 分钟。然后置染色液中浸泡 10 分钟，用蒸馏水淋洗一次，最后多次换新洗脱液，直至凝胶上的背景脱净为止（奥斯伯等，1995）。

3 结果与分析

3.1 草菇蛋白酶的纯化

草菇匀浆液经分离、纯化后洗脱曲线见图 1。

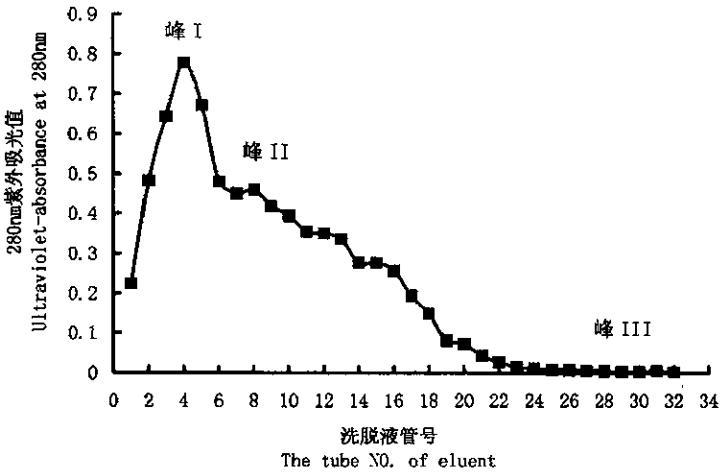


图 1 草菇蛋白酶样品经 Dextran G-150 凝胶过滤后的洗脱曲线

Fig.1 The elution curve of *V. valvacea* proteinase sample after Dextran G-150 gel filtration

T=7.5% C=3%

表 2 等电点聚焦电泳制胶配方

Table 2 The gel recipe of isoelectric focusing electrophoresis

凝胶浓度与交联度	
The concentration and crosslinking density of gel	
单体贮液 (mL)	3.75
40%载体两性电解质 (mL)	0.9
重蒸水 (mL)	10.25
10%过硫酸铵 (uL)	75
四甲基乙二胺 (TEMED) (uL)	8

根据图 1 将 1~6 号管、7~30 号管、31~32 号管的洗脱液分别合并为 A 组份、B 组份、C 组份，上述各组份与 BSA 反应后吸光光度值的变化见表 3。

表 3 洗脱液各组份在 595nm 处的吸光光度值

Table 3 The absorbance of eluent at 595nm

组 份	A 样	A 对	B 样	B 对	C 样	C 对
Component						
吸 光 值	0.382	0.406	0.362	0.284	0.306	0.182
Absorbance						

由表 3 得知只有 A 组份才含具蛋白酶活性的成分，B 组份、C 组份均未显示蛋白酶活性。取 A 组份草菇蛋白酶样品用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其纯度，电泳结果表明，其在 10% 的分离胶中只表现出一条带（李世贵等，2000）。

3.2 草菇蛋白酶等电点的测定

用等电点聚焦电泳测定草菇蛋白酶的等电点，电泳图谱示于图 2。

以宽范围等电点标准蛋白（Lane1）为对照，根据其电泳图谱中七条带已知的等电点值，

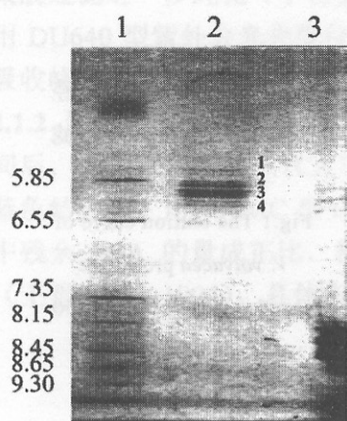


图 1 草菇蛋白酶样品 (Lane2) 的四条主要条带 r1、r2、r3、r4 的等电点值分别为: 5.9103, 5.9828, 6.0793, 6.1638

采用 Pharmacia 的 Image Master VDS 成像软件, 计算出草菇蛋白酶样品 (Lane2) 的四条主要条带 r1、r2、r3、r4 的等电点值分别为: 5.9103, 5.9828, 6.0793, 6.1638。

用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测草菇蛋白酶样品纯度时, 只显示出一条带; 但等电点聚焦电泳测定其等电点时, 表现出多条带。说明, 等电点聚焦电泳对此草菇蛋白酶样品的纯度分析灵敏度较高。基于两种检测方法的原理在于前者是依据其分子大小, 后者是根据其所带电荷多少来进行分离的。推测产生这一结果的主要原因可能是此草菇蛋白酶样品中含有分子大小相差甚微, 但所带电荷不同的几个组分, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳还不能达到分离它们的目的。因此, 可以得出仅通过硫酸铵分步沉淀和 Dextran G-150 凝胶过滤两个步骤来纯化草菇蛋白酶样品是不够的; 如果在知道其等电点的大致范围后, 增加离子交换层析这一纯化步骤, 则有可能起到进一步纯化草菇蛋白酶样品的作用。

### [REFERENCES]

- Chen MJ, Wang ZY, He DM, Pan YJ, 1995. A study of *V. Volvacea* protein composition change after low temperature treatment. *Acta Edulis fungi*, 2 (4): 28~31.
- Frederick M. Ausubel *et al.*, 1995. Short protocols in molecular biology (3rd ed.). Translated by Yan ZY, Wang HL in 1998. Beijing: Science Press. 1~861.
- Guo RJ, 1999. The experimental technology of protein electrophoresis. Beijing: Science Press. 1~348.
- Li SG, Chen MJ, Ling XF, 2000. The identification of proteinase from *V. Volvacea*. *Acta Edulis fungi*, 7 (3): 21~24.
- Wang CQ, Li YL, Li DC, 1994. Advanced experimental tutorial on biochemistry. Beijing: Beijing University Press. 1~202.

### [附中文参考文献]

- 王重庆, 李云兰, 李德昌等, 1994. 高级生物化学实验教程. 北京: 北京大学出版社. 1~202
- 李世贵, 陈明杰, 凌霞芬, 2000. 草菇蛋白酶的鉴定. 食用菌学报, 7 (3): 21~24
- 陈明杰, 汪绍月, 贺冬梅等, 1995. 低温影响草菇蛋白质组分变化的研究. 食用菌学报, 2 (4): 28~31
- 郭尧君, 1999. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社. 1~348
- F. 奥斯伯等, 1995. 精编分子生物学实验指南 (第三版). 颜子颖, 王海林译, 1998. 北京: 科学出版社. 1~861

## ISOLATION, PURIFICATION AND THE ASSAY OF ISOELECTRIC POINT OF PROTEINASE FROM *VOLVARIELLA VOLVACEA*

LI Shi-Gui<sup>1</sup>

CHEN Ming-Jie<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Soils and Fertilizers Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

(<sup>2</sup>Edible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106)

**ABSTRACT:** The isoelectric point of *Volvariella volvacea* proteinase was assayed by isoelectric focusing electrophoresis after preliminarily isolating and purifying. These results will help us to study the relationship between the proteinase and autolysis of *V. volvacea*.

**KEY WORDS:** *Volvariella volvacea*, proteinase, isoelectric point, low temperature, autolysis