

凝胶板植酸酶活力检测

江 均 平

(中国农业科学院原子能利用研究所,北京 100094)

摘要 将 1mm 厚凝固于复印膜上的水琼脂(1.5%~2.0%)凝胶板浸入含 1.2mol/L 植酸钠的 Gly-HCl 缓冲液中达 1h 以上,取出干至胶表面无水迹,于上加 *Aspergillus* sp. 59-2 植酸酶或与电泳后的凝胶板紧贴 10~60min。然后水平置于恒温水浴锅中反应一定时间,取出浸入 1mol/L H_2SO_4 -2% $(NH_4)_6Mn_7O_{24}$ -10% $FeSO_4$ 溶液显色 2~5min。该法简便、快速、灵敏,反应 15min 即可检出每 cm^2 低于 0.0045u 的植酸酶。此法适用于微生物的初筛、酶谱分析及酶比活的比较。

关键词 植酸酶,酶谱,凝胶酶活力显色

在饲料中添加植酸酶可使鸡猪等单胃动物对植酸磷的利用率从 0 提高到 50%,其粪便中的含磷量可降低 35%~50%,从而可节省饲料中无机磷的添加量并可降低粪便磷对环境造成的污染^[1,2]。此外添加植酸酶还可以提高矿物质及其它营养成分的生物效价^[3]。因此,微生物植酸酶的开发和利用越来越受到重视。在微生物选育工作中如何快速方便检测发酵液酶的活性以及酶的比活对加速植酸酶的研究开发利用具有一定的意义。

植酸在植酸酶的作用下生成磷酸,而磷酸可与钼酸铵作用生成磷钼酸复合物,在硫酸亚铁存在下这种复合物被还原成蓝色化合物,在一定浓度范围内无机磷浓度与颜色深浅成线性关系^[4]。本文利用上述原理在凝胶板上直接检测植酸酶活性。

1 材料和方法

1.1 材料

植酸酶系 *Aspergillus* sp. 59-2 发酵滤液^[5]。

化学试剂 Sodium phytate 为 sigma 产品,琼脂为试剂级,其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 琼脂凝胶板:将一块玻璃板(大小根据需而定)水平放置,并在上面滴几滴蒸馏水,其上紧贴一块同样大小的复印胶膜,在复印胶膜上放置一橡皮垫圈(厚 1mm,边宽 5~

10mm),其上盖一块同样大小的玻璃板。用文具夹夹紧两块玻璃板,于恒温箱中保温至 50℃ 或手持电炉旁烤至约 50℃,用滴管将溶解好的热琼脂水溶液(1.5%~2%)灌入模具中,注意不要形成气泡,冷却待用。

1.2.2 底物—琼脂凝胶板:将凝固后的琼脂板连复印胶膜一起取下,于空气中干燥至琼脂凝胶板表面无水迹(这样琼脂凝胶与复印胶膜贴得更牢固),然后浸入含底物的反应体系溶液中,为确保与酶促反应体系完全一致,可更换 2~3 次底物溶液,每次将凝胶浸没即可,亦可用与琼脂凝胶等体积底物溶液(浓度比反应体系浓度高一倍)浸泡,浸泡时间不少于 1h,也可较长时间浸泡。然后取出于空气中干燥至凝胶表面无水迹(如表面较湿,酶液会扩散)。

1.2.3 发酵液酶活力检测:取一块复印胶膜,用打孔器每隔 10~15mm 打上小孔(直径 3~5mm);将此膜轻轻贴于底物—琼脂凝胶板上,注意不要形成气泡,每孔加 5 μ l 酶液,水平置恒温(37℃)水浴锅中保温保湿反应至所需时间即可,注意不要让水浴锅中的凝结水滴到琼脂凝胶上。

1.2.4 显色:取出反应后的凝胶板于室温下浸入显色剂中 2~5min,并立即拍照。

2 结果与讨论

利用凝胶板检测酶活力,一般在高温的琼脂溶液中加入底物和缓冲液来制备凝胶板,但在酸性条件下琼脂凝固不结实,而且有些底物在高温条件下不稳定,对于一些易变性或挥发性的缓冲液经高温处理亦导致 pH 值改变。故本文就以上几方面问题设计了凝胶板植酸酶活力检测方法。

2.1 显色剂浓度对植酸酶活力显色的影响

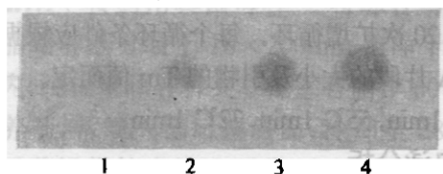


图1 琼脂凝胶板植酸酶活力检测

植酸酶添加量(u/cm^2):

1. 0.0045; 2. 0.009; 3. 0.018; 4. 0.036

琼脂凝胶板于含 1.2 mol/L 植酸钠的 0.1 mol/L Gly-HCl 缓冲液 ($\text{pH}2.0$) 中浸泡 1h 以上,于 5mm 孔中加 $5\mu\text{L}$ 植酸酶溶液,于 37°C 水浴锅中反应 15min,用 4 种不同浓度的显色剂 (① 1 mol/L H_2SO_4 -2% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ -10% FeSO_4 ; ② 0.75 mol/L H_2SO_4 -1.5% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ -7.5% FeSO_4 ; ③ 0.5 mol/L H_2SO_4 -1% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ -5% FeSO_4 ; ④ 0.25 mol/L H_2SO_4 -0.5% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ -2.5% FeSO_4 显

色 2min, 结果表明①号显色剂显色效果较好 (图 1), 反应 15min 可检出每 cm^2 低于 0.0045u 植酸酶。此凝胶不能久放,需及时照相。

2.2 凝胶电泳酶谱分析及比活检测

取等活力单位酶液进行普通凝胶电泳或等电聚焦凝胶电泳,电泳毕取下电泳凝胶于空气中干燥至表面无水迹,将底物—琼脂凝胶板轻轻紧贴于电泳凝胶上,注意两凝胶接触面不应有气泡,电泳凝胶另一面亦可以贴上含不同底物或不同反应条件的底物—琼脂胶板。根据所加酶的活力决定扩散时间,一般 10~60min 即可 (注意放置时间越长,电泳带扩散越严重),并在两块凝胶上打一小孔以便蛋白带和酶活力带的比较及定位,然后将电泳凝胶进行蛋白质染色,底物—琼脂凝胶板进行酶活力检测。对蛋白带和酶带进行薄层扫描即可初步测定酶的相对比活力。

参 考 文 献

- [1] Simons P C M, Kemme P A, Jongbloed A W. *et al.* British Journal of Nutrition 1990, 64: 525~540.
- [2] Pallauf Von J, Höhler D H, Rimbach G. *et al.* J Anim physiol Anim Nutr. 1992, 67: 30~40.
- [3] Pallauf Von J, Höhler J D H, Rimbach G J. *et al.* J Anim physiol Anim Nutr, 1992, 68: 1~9.
- [4] Taussky H A, Shorr E J. *Biol Chem*, 1953, 202: 675.
- [5] 江均平. 微生物学报, 1996, 36(6): 432

DETECTION OF PHYTASE IN GELS

Jiang Junping

(Institute for Application of Atomic Energy, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract A sheet of agar gel (1.5%~2.0%, 1mm thickness) on copy film was soaked in Gly-HCl buffer containing 1.2 mol/L sodium phytate for over 1h and then taken out. After the moisture on the gel surface disappeared, phytase was spotted on or an electrophoresed polyacrylamide gel containing phytase was placed in contact with it for 10~60min, then the agar gel was horizontally incubated in water bath for 15 min at 37°C , finally the gel was immersed in 1 mol/L H_2SO_4 -2% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ -10% FeSO_4 for 2~5min. to develop its colour. This assay is simple, rapid and highsensitive, as little as 0.0045 u phytase on one cm^2 of gel could be detected, which is suitable for screening microorganism, zymogram analysis and comparing specific activities of phytases.

Key words Phytase, Zymogram, Detection of phytase in agar gel