



大豆核酸酶的提取及活力测定

胡 敏·原 麟

(大庆师范学院 生物工程学院,黑龙江 大庆 163712)

摘要:为优化大豆核酸酶的提取工艺并测定其活力,分别通过考察单因素试验和正交试验对温度、提取时间、硫酸锌浓度进行优化。结果表明:以干大豆粉为原材料,温度为 60 ℃、提取时间为 20 h、硫酸锌浓度为 0.25 mol·L⁻¹时,大豆核酸酶活力最高,为 198.24 U·mL⁻¹。影响大豆核酸酶提取的因素主次顺序为提取时间、温度、硫酸锌浓度。

关键词:大豆;核酸酶;酶活力

大豆中富含异黄酮,可以断绝癌细胞营养供应,其中含有人体必需的 8 种氨基酸,多种微量元素多及维生素,能使血中胆固醇降低,对于预防高血压、冠心病、动脉硬化等有很大的功效。大豆内还富含亚油酸,对促进儿童神经发育有很大的作用。

大豆中除了含有丰富的营养物质外^[1],还含有大量生物活性物质,因此具有相当高的医药用价值。其中含有的核酸酶可将单链 DNA 水解为 5'端带磷酸基团的单核苷酸或寡核苷酸,可用于食品添加剂、生化药物、保健品等的生产,具有相当广阔的前景和很高的价值^[2]。本文通过单因素试验(温度、提取时间、硫酸锌浓度)和正交试验,对大豆核酸酶提取工艺进行优化,为大豆核酸酶地进一步开发利用提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆样本为大庆市让胡路区庆客隆超市售;醋酸钠、硫酸锌、冰醋酸、高氯酸等均为分析纯。

752N 紫外可见分光光度计(北京森雷博瑞实验室设备有限公司),PDZ5-WS 低速自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),DHG-9245A 恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),BS124S 电子天平(北京塞多利仪器系统有限公司),HHS 型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 方法

1.2.1 大豆预处理 将大豆分成 2 份,其中 1 份浸泡 48 h,另外 1 份研磨成干粉。

1.2.2 底物 DNA 溶液的制备 采用酚/氯仿抽提法提取大肠杆菌基因组 DNA,在 260 nm 处测定 OD 值,计算底物 DNA 浓度,放置在 4 ℃冰箱备用^[3-4]。

1.2.3 干粉和湿粉对大豆核酸酶提取的影响 将 5 g 浸泡 48 h 的大豆置于研钵中,冰上研磨,与 5 g 大豆干粉分别放入装有 100 mL 蒸馏水的烧杯中,4 ℃恒温冰箱中 20 h,分别加入 0.2 mol·L⁻¹醋酸钠缓冲溶液(含 0.25 mol·L⁻¹ ZnSO₄),过滤弃滤渣,滤液 60 ℃水浴 30 min,水浴后放置室温,离心 10 000 r·min⁻¹,时间 15 min,取上清液对底物 DNA 溶液进行降解,在 260 nm 处测 OD 值,计算大豆核酸酶活力。

1.2.4 大豆核酸酶提取的单因素试验 硫酸锌浓度对大豆核酸酶提取的影响:取大豆 25 g,平均分成 5 份,进行大豆核酸酶液提取,分别加入 0.2 mol·L⁻¹醋酸钠缓冲溶液(分别含 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mol·L⁻¹ ZnSO₄),取上清液对底物 DNA 溶液进行降解,在 260 nm 处测 OD 值,计算大豆核酸酶活力。

提取时间对大豆核酸酶提取的影响:取大豆 25 g,平均分成 5 份,进行大豆核酸酶液提取,在 4 ℃恒温冰箱中分别放置 5、10、15、20、25 h,取上清液对底物 DNA 溶液进行降解,在 260 nm 处测 OD 值,计算大豆核酸酶活力。

温度对大豆核酸酶提取的影响:取大豆 25 g,平均分成 5 份,进行大豆核酸酶液提取,过滤后滤液分别在 50、55、60、65、70 ℃下水浴,取上清酶液对底物 DNA 溶液进行降解,在 260 nm 处测 OD 值,计算大豆核酸酶活力。

1.2.5 大豆核酸酶活力的测定 取甲乙两只 2 mL 离心管,分别加入 45 μL 底物 DNA 溶液和

收稿日期:2018-03-23

第一作者简介:胡敏(1981-),女,硕士,讲师,从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:56655275@qq.com。

40 μL pH 5.0 的 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲溶液(含 0.25 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnSO_4),于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 10 min,然后在甲管中加入 10 μL 大豆核酸酶液,继续保温 10 min。甲乙两管再分别加入高氯酸溶液(2.5%)100 μL ^[5-6],乙管补加 10 μL 酶液,冷却放置 15 min,3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清。在 260 nm 处测 OD_{260} 。以先加高氯酸的离心管为对照,在如上前提下,每分钟形成的核苷酸能使 260 nm 处的光密度差为 1.0 的量,定义为一个酶活单位。计算公式如下:

$$\text{酶活力} = (\text{OD}_{260} \text{ 甲} - \text{OD}_{260} \text{ 乙}) \times A/B \quad (1)$$

式中: OD_{260} 甲—试验组在 260 nm 处 OD 值; OD_{260} 乙—空白组在 260 nm 处 OD 值;A—底物 DNA 浓度值为 0.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;B—反应时间值为 10 min。

1.2.6 大豆核酸酶提取的正交试验 对硫酸锌浓度、提取时间、温度进行三因素三水平的正交试验,进而确定大豆核酸酶最佳的提取方案。

2 结果与分析

2.1 干粉和湿粉对大豆核酸酶提取的影响

由表 1 可知,大豆的干粉状态下的酶活力更高,在湿粉的条件下酶活力降低甚至失活。主要原因包括浸泡后的大豆核酸酶一部分溶于水中无法收集,另一部分可能被水解导致酶含量下降。

表 1 干粉和湿粉对大豆核酸酶提取的影响

Table 1 Effect of dry and wet powder on the extraction of soybean nuclease

项目 Items	OD_{260}	酶活/($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) Enzyme activity
干粉 Dry powder	0.279	133.92
湿粉 Wet powder	0.054	25.92

2.2 单因素试验

2.2.1 硫酸锌浓度对大豆核酸酶提取的影响结果 在硫酸锌浓度分别为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下进行大豆核酸酶提取。由图 1 可知,从 0.10~0.25 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 随着硫酸锌浓度增大酶活力也增大。当硫酸锌含量达到 0.25 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时酶活力达到最大,为 198.24 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。原因是过多的硫酸锌会使缓冲液呈酸性不利于核酸酶的存活,使单位体积提取液中核酸酶活力降低。而醋酸钠缓冲液呈碱性,放入过少的硫酸钠,缓冲液仍呈碱性也不利于酶的存活。

2.2.2 提取时间对大豆核酸酶提取的影响结果 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温冰箱中分别放置 5、10、15、20、25 h

条件下进行大豆核酸酶提取。由图 2 可知,提取时间过长过短都会影响大豆核酸酶的活力,提取时间为 20 h 时酶活力达到最大值,为 184.48 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。提取时间过长,核酸酶活力反而降低,主要因为在提取环境下存留过长时间引起部分酶活降低或失活。

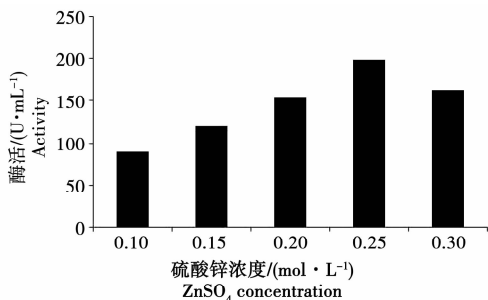


图 1 硫酸锌浓度对大豆核酸酶提取的影响

Fig. 1 Effect of ZnSO_4 concentration on the extraction of soybean nuclease

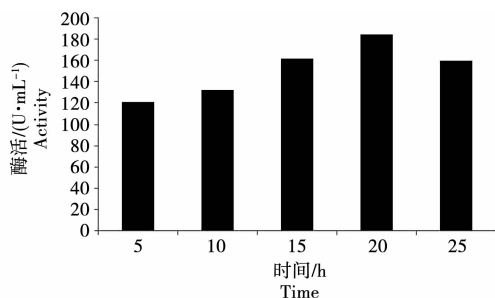


图 2 提取时间对大豆核酸酶提取的影响

Fig. 2 Effect of time on the extraction of soybean nuclease

2.2.3 温度对大豆核酸酶提取的影响结果 滤液分别在 50、55、60、65、70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行大豆核酸酶提取,由图 3 可知,大豆核酸酶在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下提取的酶活力最大,为 190.08 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-2}$ 。提取大豆核酸酶活随着提取温度的升高而增大,当达到 60 $^{\circ}\text{C}$ 时最大,随着温度的继续升高酶活下降,且随着温度的逐渐升高,酶活力下降越来越快。

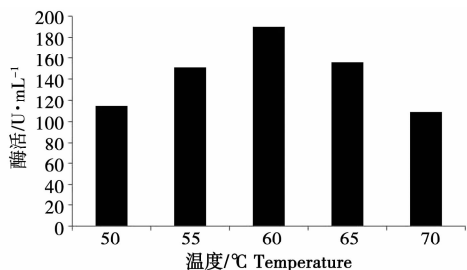


图 3 温度对大豆核酸酶提取的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the extraction of soybean nuclease

2.3 正交试验

由表 3 可以看出,影响大豆核酸酶提取结果的因素由大到小依次为提取时间、温度、硫酸锌浓度。通过直观分析,大豆核酸酶提取的最佳工艺为 A₂B₂C₂,即温度为 60 ℃、提取时间为 20 h、硫酸锌浓度为 0.25 mol·L⁻¹时,提取的大豆核酸酶活力最高,为 198.24 U·mL⁻¹。

表 2 正交试验的水平及因素

Table 2 Levels and factors of orthogonal test			
水平 Levels	A 硫酸锌浓度/ (mol·L ⁻¹) ZnSO ₄ concentration	B 提取时间/h Extraction time	C 温度/℃ Temperature
1	0.20	15	55
2	0.25	20	60
3	0.30	25	65

表 3 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test

序号 No.	A 硫酸锌浓度 ZnSO ₄ concentration	B 提取时间 Extraction time	C 温度 Temperature	OD ₂₆₀	酶活/(U·mL ⁻¹) Enzyme activity
1	1	1	1	0.328	157.44
2	2	2	2	0.413	198.24
3	3	3	3	0.323	155.04
4	1	2	3	0.362	173.76
5	2	3	1	0.334	165.12
6	3	1	2	0.343	164.64
7	1	3	2	0.365	175.20
8	2	1	3	0.308	147.84
9	3	2	1	0.378	181.44
k ₁	168.800	156.640	168.000		
k ₂	170.400	184.480	179.360		
k ₃	167.040	165.120	158.880		
R	3.360	27.840	20.480		

3 结论

以大豆作为试验材料,测定大豆核酸酶酶活为考察指标。通过结果分析得出大豆核酸酶的最佳提取条件为:原料为干粉状态、提取时间 20 h、温度 60 ℃、硫酸锌浓度 0.25 mol·L⁻¹。在以上条件下大豆核酸酶粗酶液的酶活为 198.24 U·mL⁻¹。

参考文献:

[1] 罗诗茹,蔡玉莲,朱冠琳,等. 黑豆、黄豆、红豆、绿豆中的蛋白质含量比较[J]. 科技视界,2014(20):69.

[2] 王楠,蔡夏夏,李勇. 外源核苷酸与免疫功能研究进展[J]. 食品科学,2016,37(5):278-282.
[3] 郑胜彪,唐婧. 紫外分光光度法同时测定鸡精中谷氨酸钠和呈味核苷酸[J]. 中国调味品,2009,34(5):92-94.
[4] 丁小云,耿俊丽,魏成熙. 不同破壁方法对大肠杆菌 DNA 提取的影响[J]. 贵州农业科学,2010,38(4):149-150.
[5] 吕浩,应汉杰. 核酸酶 P1 的纯化和酶学性质研究[J]. 南京工业大学学报,2002,24(6):66-69.
[6] 陈洁,王璋. 麦芽根中核酸酶的提取及制备[J]. 食品工业科技,2000,21(1):19-22.

Extraction and Viability Determination of Soybean Nucleases

HU Min, YUAN Lin

(College of Life Science, Daqing Normal University, Daqing 163712, China)

Abstract: In order to optimize the extraction conditions of soybean nuclease and determine its vitality. The extracting conditions including the temperature, the extraction time, the ZnSO₄ concentration were optimized by single-factor experiment and orthogonal test. The results showed that the dry soybean powder was used, the temperature was 60 ℃, the extraction time was 20 h, the ZnSO₄ concentration was 0.25 mol·L⁻¹, and the maximum vitality of soybean nuclease was 198.24 U·mL⁻¹. The main and secondary factors affecting the extraction of soybean nuclease were the extraction time, the temperature, the ZnSO₄ concentration.

Keywords: soybean; nuclease; enzyme vitality