

# 鸭心苹果酸脱氢酶的分离纯化及酶学性质

孙芳, 胡瑞斌, 任美凤, 唐云明\*

(西南大学生命科学学院, 重庆市甘薯工程研究中心, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

**摘要:** 取新鲜鸭心, 通过匀浆、硫酸铵沉淀、有机溶剂沉淀、DEAE-Sepharose层析以及Superdex-200层析等方法纯化, 获得鸭心中所含的两种电泳纯的苹果酸脱氢酶同工酶(c-MDH和m-MDH), 并对粗酶液中含有较高的c-MDH进行酶学性质研究。结果表明: c-MDH和m-MDH纯化倍数分别为69.07倍和130.40倍, 酶活力回收率分别为25.54%和10.98%, 亚基分子量分别为39.58ku和37.62ku。c-MDH酶学性质研究表明: 该酶最适反应温度为55℃, 在30℃以下时比较稳定; 最适反应pH为7.2, 在pH6~9范围内稳定性较好; 其对草酰乙酸的 $K_m$ 值为140.93 $\mu\text{mol/L}$ ; 草酸、SDS、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$ 对该酶的抑制作用非常强烈, 而 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 对该酶表现出明显的激活作用。

**关键词:** 鸭心; 苹果酸脱氢酶; 分离纯化; 性质

## Isolation, Purification and Characterization of Malate Dehydrogenase from Duck Heart

SUN Fang, HU Rui-bin, REN Mei-feng, TANG Yun-ming\*

(Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing Sweetpotato Engineering Research Center, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** Two electrophoresis-pure isoenzymes (c-MDH and m-MDH) of malate dehydrogenase from duck heart were obtained through the procedures including homogenization, ammonium sulfate precipitation, organic solvent precipitation, DEAE-sepharose chromatography and Superdex-200 gel filtration. c-MDH present in the crude enzyme solution in a higher amount was characterized. The results showed that the purity of c-MDH and m-MDH were increased by 69.07- and 130.40-fold with activity recoveries of 25.54% and 10.98%, respectively. The molecular mass of the subunits in c-MDH and m-MDH were 39.58 ku and 37.62 ku, respectively. Enzymatic characterization showed that the optimal reaction temperature and pH for c-MDH were 55 °C and 7.2, respectively, and it was stable below 30 °C and at pH 6–9. Meanwhile, its  $K_m$  using oxobutanedioic acid as the substrate was 140.93  $\mu\text{mol/L}$ . The enzyme activity could be strongly inhibited by oxalic acid, SDS,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ag}^+$ , while it could be obviously activated by  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Ba}^{2+}$ .

**Key words:** duck heart; malate dehydrogenase (MDH); isolation and purification; characterization

中图分类号: Q814.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0239-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323049

苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)广泛存在于动物、植物以及微生物体内, 是生物体进行糖代谢的关键酶之一, 主要催化草酰乙酸(OAA)和苹果酸之间进行可逆转化。根据辅酶特异性, MDH可分为NAD-依赖型MDH(NAD-MDH)和NADP-依赖型MDH(NADP-MDH)。在真核细胞中, NAD-MDH分布于细胞质和线粒体中, 分别为c-MDH(cytosolic MDH)和m-MDH(mitochondrial MDH), 常以同型二聚体形式存在<sup>[1]</sup>。因MDH在常温下具有比较好的热稳定性和耐碱性, 催化活性高、特异性强、作用条件温和等特性, 现已广泛应用于医学诊断、食品及发酵过程中有机酸的检测、糖果制品和饮料中的食品添加剂、

生物制药中四碳有机手性源——D-苹果酸的制备等领域<sup>[2-3]</sup>。已有多种来源的MDH得到了详细研究<sup>[4]</sup>, 但未见家禽类心脏中MDH的研究报道。

我国是世界上最大的鸭生产和消费国, 鸭肉的年总产量约占世界总量的近70%<sup>[5]</sup>, 鸭心是鸭肉加工过程中的重要副产品, 总量非常大; 而且, MDH在鸭心中含量比较丰富。因此, 本研究以来源广泛的鸭心为材料, 对鸭心所含有的两种MDH同工酶(c-MDH和m-MDH)进行分离纯化, 并对粗酶液中含有较高的一种同工酶(c-MDH)进行了部分酶学性质研究, 旨在为该酶的获得提供一条新的途径, 为MDH同工酶的深入研究及应用提供参考。

收稿日期: 2012-11-07

基金项目: 重庆市科委重点攻关项目(CSTC, 2011AB1027)

作者简介: 孙芳(1988—), 女, 硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: scncsfang@163.com

\*通信作者: 唐云明(1960—), 男, 教授, 博士, 主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: tbright@swu.edu.cn

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 材料

家鸭(*Anas platyrhynchos*)心脏: 来源于健康的四川麻鸭, 将活鸭杀死后, 立即取其心脏于-20℃冰箱中保存备用。

#### 1.1.2 试剂

DEAE-Sepharose、Superdex-200、凝胶过滤层析分子质量标准品、蛋白质SDS-PAGE标准品 美国GE Healthcare公司; NADH、牛血清白蛋白 美国Sigma公司; 草酰乙酸 中国阿拉丁试剂(上海)有限公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺 瑞士Fluka公司; 其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 鸭心MDH粗酶液的制备

将新鲜鸭心用剪刀除去脂肪和结缔组织后, 取100g剪碎后用生理盐水漂洗至洗液无血红色, 加入300mL预冷的缓冲液A(100mmol/L pH7.5的PBS缓冲液, 内含1mmol/L的EDTA-Na<sub>2</sub>, 2mmol/L的ME), 匀浆后于4℃冰箱静置抽提4h, 使酶充分溶出, 10000r/min离心15min, 收集上清液; 向其中加入硫酸铵至40%饱和度(此状态下大部分杂蛋白形成沉淀, 目的蛋白MDH大量存在于上清中), 4℃静置 3h 后, 10000r/min离心15min, 收集上清液; 再向其中加入硫酸铵至70%饱和度(此状态下存在于上清中的目的蛋白MDH大部分都已沉淀下来), 4℃静置 3h后, 12000r/min离心30min, 收集沉淀; 为避免后续与柱子结合过程中, 缓冲液中盐离子发生干扰作用, 沉淀用缓冲液B(50mmol/L pH7.8的Tris-HCl 缓冲液)溶解, 4℃条件下缓冲液C(20mmol/L pH7.8的Tris-HCl 缓冲液)中透析1d后, 10000r/min离心20min, 收集上清液; 分别按照体积分数20%加入乙醇和氯仿(此比例能够去除大量杂蛋白, 同时对酶活影响较小)向其中加入预冷的乙醇和氯仿, 4℃静置1h后, 10000r/min离心10min, 收集上清液即为粗酶液。

#### 1.2.2 DEAE-Sepharose离子交换层析

DEAE-Sepharose离子交换层析柱利用缓冲液D(50mmol/L pH8.4的Tris-HCl)平衡后, 取粗酶液9mL上柱, 用0~0.5mol/L的NaCl溶液(用缓冲液D配制)进行线性梯度洗脱, 流速0.5mL/min, 每管收集5mL; 测定各管MDH活力和蛋白质含量, 分别收集c-MDH和m-MDH活性峰中活性较高的几管酶液, 并将收集到的m-MDH用缓冲液C透析后, 进行冷冻干燥。

#### 1.2.3 Superdex-200凝胶过滤层析

##### 1.2.3.1 c-MDH的Superdex-200层析

取经离子交换层析收集到的c-MDH合并在一起的

酶液4mL上缓冲液B平衡好的Superdex-200层析柱。用0.18mol/L的NaCl溶液(用缓冲液B配制)洗脱200mL, 流速为0.3mL/min, 每管收集3mL。测定每管酶活力以及蛋白质含量, 收集活性较高的几管酶液, 用超纯水透析脱盐, 冷冻干燥后备用。

##### 1.2.3.2 m-MDH的Superdex-200层析

将m-MDH冷冻干燥后得到的粉末用缓冲液B溶解, 取4mL上缓冲液B平衡好的Superdex-200层析柱。用0.15mol/L的NaCl溶液(用缓冲液B配制)洗脱200mL, 其余条件和处理方法同1.2.3.1节。

#### 1.2.4 鸭心苹果酸脱氢酶纯度鉴定及分子质量测定

通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对1.2.3节所获得的c-MDH和m-MDH进行纯度鉴定和亚基相对分子质量测定<sup>[6]</sup>, 采用5%浓缩胶和12%分离胶; 经凝胶过滤层析测定其全分子质量。

#### 1.2.5 MDH活力的测定

参照文献[2]进行: MDH在催化草酰乙酸转化为苹果酸的同时, 将NADH氧化为NAD, 使得NADH在340nm波长处吸光度不断降低, 连续测定酶反应过程中340nm波长处吸光度的变化即可算出酶活。酶活单位定义: 25℃时, 1min氧化1μmol的NADH所需的酶量为1个酶活力单位<sup>[7]</sup>, 即1U, 利用下式计算酶活力(*E*)。

$$E/(U/mL) = \frac{\Delta A_{340nm}/t \times V_T \times DF}{V_S \times \epsilon \times b}$$

式中:  $\Delta A_{340nm}$ 为测定过程中吸光度的减少量; *t*为测定时间/min;  $V_T$ 为反应总体积/mL;  $V_S$ 为样品体积/mL; DF为稀释倍数;  $\epsilon$ 为NADH在340nm波长处的摩尔吸光度系数(6.22L/(μmol·cm)); *b*为比色皿光径/cm。

#### 1.2.6 蛋白质含量测定

分别采用紫外分光光度法和考马斯亮蓝染料法(Bradford法)对蛋白质含量进行测定<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.7 鸭心c-MDH酶学性质研究

##### 1.2.7.1 鸭心c-MDH的最适温度与热稳定性

将纯化后的酶液分别置于不同温度(20~60℃), pH7.5条件下保温不同的时间后, 测定c-MDH的酶活力, 以不保温时的酶活力为100%, 计算保温不同时间时酶的相对酶活力, 以研究该酶的热稳定性。

##### 1.2.7.2 鸭心c-MDH的最适pH值与pH值稳定性

在55℃, 将纯化后的酶液分别置于不同pH(5~10)的缓冲液中放置4h, 测定酶活力, 以酶活最高值为100%, 计算各pH值下的相对酶活力, 以研究该酶的pH值稳定性。

##### 1.2.7.3 鸭心c-MDH米氏常数( $K_m$ )的测定

用不同浓度的草酰乙酸(0.15~0.6mmol/L), 在30℃、pH7.5的条件下测定鸭心c-MDH的酶活力, 采用双倒数作图法(Lineweaver-Burk法)<sup>[9]</sup>求出鸭心c-MDH的 $K_m$ 值。

1.2.7.4 不同有机溶剂对鸭心c-MDH活性的影响

将纯化后的酶液分别与等体积的不同体积分数的甲醇、乙醇、异丙醇、氯仿有机溶剂混合,作用30min,以不加有机溶剂时的酶活力为100%,计算c-MDH的相对酶活力。

1.2.7.5 不同化合物对鸭心c-MDH活性的影响

将纯化后的酶液分别与等体积的不同浓度的EDTA-Na<sub>2</sub>、抗坏血酸、过氧化氢、草酸、尿素、十二烷基硫酸钠(SDS)混合,作用30min,以不加化合物时的酶活力为100%,计算c-MDH的相对酶活力。

1.2.7.6 不同金属离子对鸭心c-MDH活性的影响

将纯化后的酶液分别与等体积的含不同浓度金属离子的溶液混合,作用30min,以不加金属离子时的酶活力为100%,计算c-MDH的相对酶活力。

2 结果与分析

2.1 鸭心c-MDH和m-MDH的分离纯化

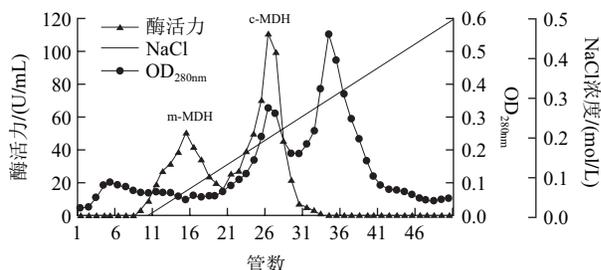


图1 鸭心MDH的DEAE-Sepharose层析图谱

Fig.1 DEAE-Sepharose chromatography of MDH from duck heart

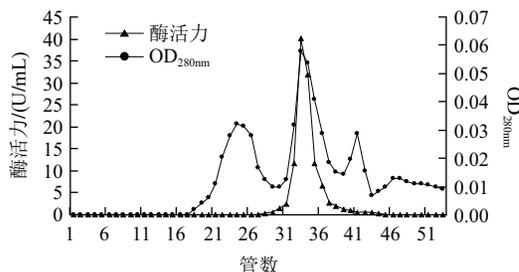


图2 鸭心c-MDH的Superdex-200层析

Fig.2 Superdex-200 chromatography of c-MDH from duck heart

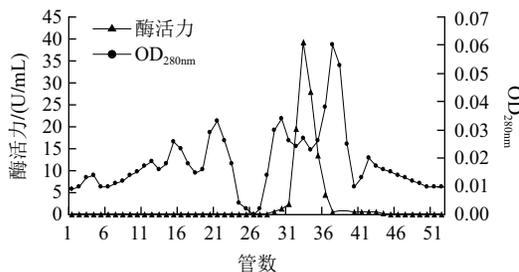
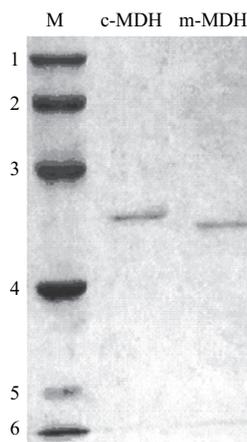


图3 鸭心m-MDH的Superdex-200层析

Fig.3 Superdex-200 chromatography of m-MDH from duck heart



1.兔磷酸化酶B 97.0ku; 2.牛血清白蛋白 66.0ku; 3.鸡卵清蛋白 45.0ku; 4.牛碳酸酐酶 30.0ku; 5.大豆胰蛋白酶抑制剂 20.1ku; 6.  $\alpha$ -牛乳白蛋白 14.4ku; M.低分子量标准蛋白。

图4 鸭心c-MDH和m-MDH的SDS-PAGE电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE of c-MDH and m-MDH from duck heart

鸭心MDH粗酶液经DEAE-Sepharose层析的结果如图1所示,出现c-MDH和m-MDH两个酶活性峰,说明粗酶液中含有两种同工酶,并且两者带电量存在差异。分别将其进行Superdex-200层析,洗脱图谱如图2、3所示,检测收集液中的酶活性,发现两同工酶的酶活性峰都主要集中在31~35管之间,在31管之前和35管之后的几管收集液中,酶的活性都很低;在出现的活性峰中,检测到两同工酶都是在第33管收集液中出现酶活性最高峰,说明两种同工酶分子质量大小相近;将冷冻干燥后的样品进行SDS-PAGE,结果如图4所示, c-MDH和m-MDH都显示为单一条带达到电泳纯。酶的整个分离纯化结果见表1,粗酶液经过一系列纯化步骤,特别是使用硫酸铵沉淀和有机溶剂沉淀的方法,去除了大量杂蛋白,最后得到酶比活力和回收率都较高的c-MDH和m-MDH。

表1 鸭心c-MDH和m-MDH的纯化结果  
Table 1 Purification of c-MDH and m-MDH from duck heart

步骤	总蛋白质量/mg	总酶活力/U	酶比活力/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
匀浆后离心	5884.86	72397.87	12.30	100	1
硫酸铵沉淀	1125.06	47076.75	41.84	65.03	3.40
有机溶剂沉淀	269.54	37210.70	138.05	51.40	11.22
DEAE-Sepharose(c-MDH)	33.72	22777.82	675.46	31.46	54.90
Superdex 200(c-MDH)	21.76	18491.77	849.70	25.54	69.07
DEAE-Sepharose(m-MDH)	19.83	12424.44	626.64	17.16	50.94
Superdex 200(m-MDH)	4.97	7951.64	1604.19	10.98	130.40

2.2 鸭心c-MDH和m-MDH分子质量的测定

通过SDS-PAGE,根据标准蛋白质分子质量与相对迁移率的关系,测得c-MDH和m-MDH亚基分子质量分别为39.58ku和37.62ku;通过Superdex-200层析粗略测得两同工酶全酶分子质量都约为77.37ku,由此可基本判定鸭心c-MDH和m-MDH都由2个相同亚基组成。

2.3 鸭心c-MDH的部分酶学性质

2.3.1 鸭心c-MDH的最适反应温度与热稳定性

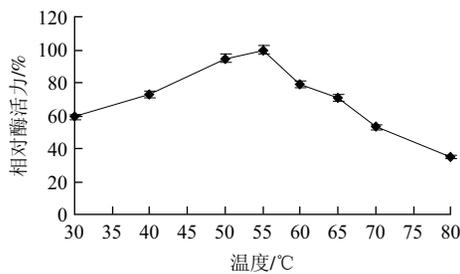


图5 温度对鸭心c-MDH酶活力的影响

Fig.5 Effect of temperature on the activity of c-MDH from duck heart

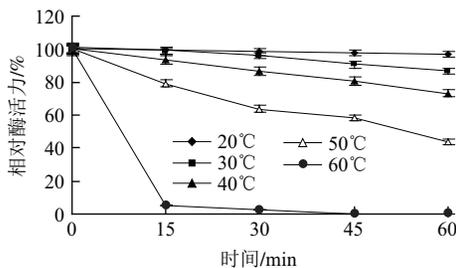


图6 鸭心c-MDH的热稳定性

Fig.6 Thermal stability of c-MDH from duck heart

由图5可知,该酶的最适反应温度为55℃,超过55℃后,酶活力下降较快,说明温度对c-MDH的活性有很大的影响。由图6可知,在40℃时保温1h后相对酶活力还剩余73%,而在温度超过50℃以后,酶活力迅速下降,60℃时保温15min后酶几乎完全失活,主要是在受热的情况下,酶蛋白分子内基团间的相互作用发生改变,酶分子的自然构象遭到破坏,导致酶催化功能的减弱甚至丧失。由此可见,该酶对高温的耐性不强,在30℃以下时比较稳定。

### 2.3.2 鸭心c-MDH的最适反应pH值与pH值稳定性

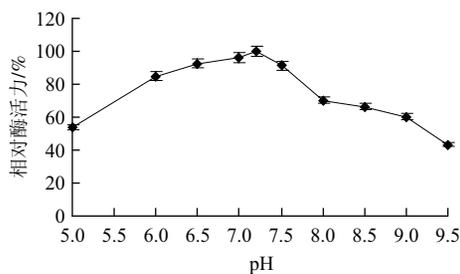


图7 pH值对鸭心c-MDH酶活力的影响

Fig.7 Effect of pH on the activity of c-MDH from duck heart

由图7可知,酶c-MDH的最适反应pH值为7.2,pH值超过7.2后,酶活力下降迅速,主要是因为pH值会影响酶活性部位催化基团和结合基团的解离状态,使酶的催化效率降低;由图8可知,pH值的耐受范围较广,在pH 6~9的条件下,稳定性较好,特别是在pH 7~8范围内,4h后酶活还高达90%以上,说明该酶具有较强的耐碱性,在较碱性的条件下能很好地维持酶的天然构象。

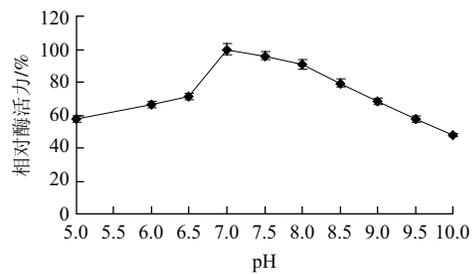


图8 鸭心c-MDH的pH值稳定性

Fig.8 pH Stability of c-MDH from duck heart

### 2.3.3 鸭心c-MDH的米氏常数

在30℃,pH7.5条件下测定不同底物浓度下的反应速率,采用Lineweaver-Burk法,求得鸭心c-MDH对草酰乙酸的 $K_m$ 值为140.93 $\mu\text{mol/L}$ (图9),介于绵羊肝脏( $K_m$ 为400 $\mu\text{mol/L}$ )和绿豆( $K_m$ 为112 $\mu\text{mol/L}$ )之间<sup>[10]</sup>,表明在催化反应过程中,酶和底物草酰乙酸之间具有较好的亲和力。

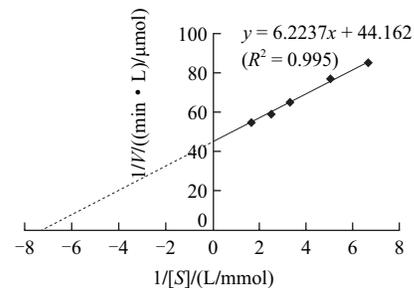


图9 双倒数法测定鸭心c-MDH的米氏常数

Fig.9 Double reciprocal plot for determining the  $K_m$  of c-MDH from duck heart

### 2.3.4 有机溶剂对鸭心c-MDH活性的影响

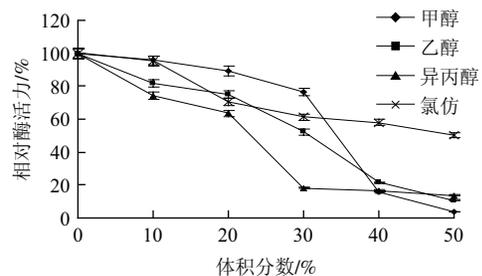


图10 甲醇、乙醇、异丙醇、氯仿对鸭心c-MDH酶活力的影响

Fig.10 Effects of methanol, ethanol, isopropyl alcohol and chloroform on the activity of c-MDH from duck heart

由图10可知,随着有机溶剂体积分数的增大,甲醇、乙醇、异丙醇、氯仿都对该酶的活性有明显的抑制作用,主要是由于有机溶剂的加入破坏了酶在水溶液中形成的极性水化层,使溶液的极性降低,导致由水分子直接或间接参与形成的氢键、疏水键及范德华力等受到破坏,从而引起酶空间构象及酶活性中心的微环境发生改变,酶的活性下降<sup>[11]</sup>。

2.3.5 不同化合物对鸭心c-MDH活性的影响

由图11可知, SDS对该酶有很强的抑制作用, 当浓度达到3mmol/L时, 酶几乎完全失活, 因为变性剂SDS能够破坏酶蛋白分子中的氢键和疏水键, 改变酶的空间构象, 使酶活性降低。由图12可知, 尿素对酶活几乎没影响; EDTA-Na<sub>2</sub>在低浓度时对该酶表现出一定的激活作用, 可能是因为EDTA-Na<sub>2</sub>不仅是一种金属螯合剂, 同时也是一种抗氧化剂, MDH是一种巯基酶, 其活性部位的巯基易被氧化<sup>[2]</sup>, EDTA-Na<sub>2</sub>在低浓度时能有效地将被氧化的巯基还原, 从而使酶表现出一定的激活作用, 而随着EDTA-Na<sub>2</sub>浓度的增大, 酶分子中与催化活性有关的金属离子被螯合, 从而使酶活受到抑制。随着化合物浓度的增大, 抗坏血酸、草酸以及过氧化氢都对该酶表现出了抑制作用, 其中草酸的抑制作用最强, 其次是抗坏血酸。

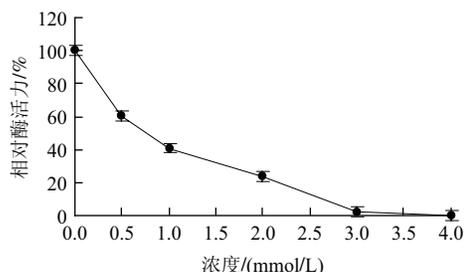


图 11 SDS对鸭心c-MDH酶活性的影响

Fig.11 Effect of SDS on the activity of c-MDH from duck heart

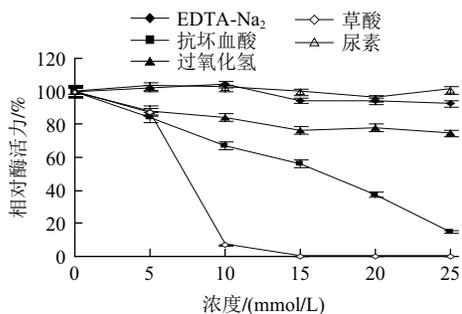


图 12 不同化合物对鸭心c-MDH酶活性的影响

Fig.12 Effects of various compounds on the activity of c-MDH from duck heart

2.3.6 不同金属离子对鸭心c-MDH活性的影响

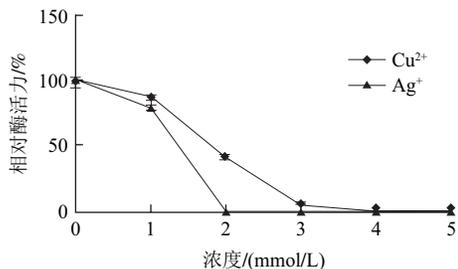


图 13 Cu<sup>2+</sup>和Ag<sup>+</sup>对鸭心c-MDH酶活性的影响

Fig.13 Effects of copper ion and silver ion on the activity of c-MDH from duck heart

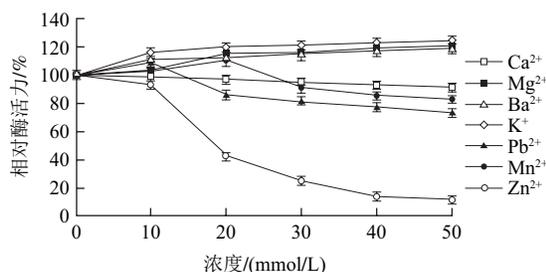


图 14 不同金属离子对鸭心c-MDH酶活性的影响

Fig.14 Effects of different metal ions on the activity of c-MDH from duck heart

由图13可知, Cu<sup>2+</sup>和Ag<sup>+</sup>对该酶的抑制作用最强, 当Ag<sup>+</sup>浓度达到2mmol/L, Cu<sup>2+</sup>浓度达到4mmol/L时, 该酶就彻底丧失酶活, Pb<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>对该酶表现出明显的抑制作用, 主要原因是这些金属离子的加入可能会改变酶的二级结构, 影响酶的三级和四级结构, 主要是影响酶的活性中心, 这可能使酶活力降低甚至失去活性<sup>[12]</sup>。由图14可知, Ca<sup>2+</sup>对该酶影响不大; Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ba<sup>2+</sup>对该酶表现出明显的激活作用, 原因是因为这些金属离子的加入, 便于形成反应时酶蛋白、金属离子、底物三元配合物的稳定过渡态, 从而极大地降低反应活化能, 加快酶促反应的速率<sup>[13]</sup>。Mn<sup>2+</sup>在低浓度时对该酶有一定的激活作用, 在高浓度时对该酶表现出明显的抑制作用。

3 结论

本研究以鸭心为实验材料, 分离纯化出其所含有的苹果酸脱氢酶的两种同工酶, 即c-MDH和m-MDH。实验中最关键的一步是将透析离心后的酶液进行有机溶剂沉淀<sup>[14]</sup>, 因为通过这种方法能够去除大量血红蛋白, 同时对酶活影响不大, 因而与纯化猪心<sup>[2]</sup>、植物单胞菌<sup>[15]</sup>、克鲁氏锥虫<sup>[16]</sup>等材料来源的MDH相比, 本实验减少了层析柱的使用次数, 所使用的方法更为简便, 但是同样得到了电泳纯的c-MDH和m-MDH。由粗酶液可知, 鸭心中MDH的酶活力高达723.98U/g, 同时我国家禽养殖规模大, 鸭心来源广, 成本低廉, 此方法操作简单, 提取出来的两种同工酶纯化倍数和比活力都较高, 并且具有耐碱性, 有望得到大规模应用。

c-MDH与m-MDH相比, 含有更多的酸性氨基酸残基, 因此酸性更强<sup>[4]</sup>, 等电点更低。粗酶液经过DEAE-Sepharese层析, 在相同pH条件下洗脱时, 则c-MDH带的负电荷量更多, 需要更高的盐浓度才能被洗脱下来。因此可以判定洗脱图谱上出现的第2个酶活峰为c-MDH活性峰。c-MDH在鸭心粗酶液中含量更高, 并且目前对动物c-MDH的研究相对较少<sup>[17]</sup>, 因此对鸭心c-MDH进行部分酶学性质研究对探索鸭心的代谢机理具有重要作用。

本实验所获得的鸭心c-MDH与m-MDH亚基分子量

分别为39.58ku和37.62ku,与多数文献报道<sup>[1-2,16,18]</sup>的NAD-MDH亚基分子质量相近;凝胶过滤测得两同工酶全酶分子质量都约为77.37ku,推断两种同工酶都由两个相同的亚基构成,这与多数文献所报道的结果一致<sup>[1-3,18]</sup>。

对鸭心c-MDH的酶学性质研究表明:该酶最适反应温度为55℃,最适反应pH为7.2,在pH7~8范围内很稳定,具有较强的耐碱性,这和猪带绦虫<sup>[19]</sup>来源的c-MDH性质很相似;该酶 $K_m$ 值为140.93 $\mu\text{mol/L}$ ,与植物单胞菌<sup>[10]</sup>及马铃薯腐疫病菌<sup>[20]</sup>来源的c-MDH相近,但与猪心<sup>[21]</sup>及细粒棘球绦虫<sup>[22]</sup>来源的c-MDH有一定差异,说明不同来源的c-MDH具有物种特异性; $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Ag}^+$ 对该酶的抑制作用最强, $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 对该酶表现出明显的激活作用, $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 对该酶表现出较强的抑制作用,这与金属离子对猪心<sup>[2]</sup>、大肠杆菌<sup>[3]</sup>、绿豆<sup>[10]</sup>等来源的苹果酸脱氢酶活性影响情况基本相同; $\text{Mn}^{2+}$ 在低浓度时对c-MDH有一定激活作用,但随着浓度的增大,酶活又逐渐受到抑制,这可能是因为二价 $\text{Mn}^{2+}$ 的含量会影响该酶本身的带电情况,当其含量较低时,对酶蛋白带电量影响较弱,酶分子空间结构没有发生明显变化,并可以促进底物与酶活性中心相互结合,形成底物-酶-金属离子复合物<sup>[23]</sup>,因而酶活性得到了增强;但当 $\text{Mn}^{2+}$ 浓度增大时,大量 $\text{Mn}^{2+}$ 的聚集改变了酶蛋白本身的带电情况,影响了酶分子的空间构型,从而酶活性逐渐受到抑制。

目前,对多种材料来源的MDH的研究已经深入到分子水平<sup>[24]</sup>,因此为了让鸭心中的MDH得到更好的开发和利用,还有待对其进行分子生物学水平上的相关研究。

#### 参考文献:

- [1] 汪新颖,王波,侯松涛,等.苹果酸脱氢酶的结构及功能[J].生物学杂志,2009,26(4):69-72.
- [2] 龚韧.猪心苹果酸脱氢酶的制备、酶学性质及应用研究[D].无锡:江南大学,2008:10-33.
- [3] 李倩.大肠杆菌苹果酸脱氢酶基因 $mdh$ 克隆、高效表达及酶学性质研究[D].无锡:江南大学,2010:1-19.
- [4] MUSRATI R A, KOLLAROVA M, MERNIK N, et al. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties[J]. General Physiology and Biophysics, 1998, 17: 193-210.
- [5] 施振旦,麦燕隆,赵伟.我国鸭养殖模式及环境控制现状和展望[J].中国家禽,2012,34(9):1-6.
- [6] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1997:100-106.
- [7] 吉尔伯特G G.酶法分析手册[M].上海:上海科学技术出版社,1983:124-126.
- [8] 李建武,余瑞元.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994:171-176.
- [9] 陈钧辉,陶力,朱婉华,等.生物化学实验[M].北京:科学出版社,2004:92-93.
- [10] 汪少芸,叶秀云,饶平凡,等.绿豆中苹果酸脱氢酶的性质及生物进化的研究[J].中国食品学报,2006,6(1):262-265.
- [11] 汪世华,张晓鹏,陈明,等.有机溶剂和变性剂对枯草芽孢杆菌溶栓酶活性的影响[J].应用与环境生物学报,2008,14(6):825-829.
- [12] 张晓晴.香樟果实酪氨酸酶的分离、纯化和性质分析[D].无锡:江南大学,2008:40-42.
- [13] 王健.金属离子对酶功能所起的作用[J].宜宾师专学报,1993(2):65-71.
- [14] 于颖,徐桂花,张洁.提取羊血SOD过程中除血红蛋白工艺的研究[J].肉类工业,2009(12):29-31.
- [15] UTTARO A D, OPPERDOES F R. Characterisation of the two malate dehydrogenases from *Phytomonas* sp., purification of the glycosomal isoenzyme[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1997, 89: 51-59.
- [16] HUNTER G R, HELLMAN U, NOWICKI C, et al. Tetrameric and dimeric malate dehydrogenase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2000, 105: 203-214.
- [17] 朱文漓,顾继锐,文博辜,等.草鱼胞质苹果酸脱氢酶(cMDH)的序列克隆及分析[J].淡水渔业,2008,38(4):66-72.
- [18] 姚玉新,郝玉金,李明,等.苹果细胞质型苹果酸脱氢酶基因克隆、表达及酶活性分析[J].园艺学报,2008,35(2):181-188.
- [19] NAVA G, LACLETTE J P, CARRERO J C, et al. Cloning, sequencing and functional expression of cytosolic malate dehydrogenase from *Taenia solium*: purification and characterization of the recombinant enzyme[J]. Experimental Parasitology, 2011, 128: 217-224.
- [20] MORENO J, LABRADOR L. Cloning, expression and biochemical characterization of mitochondrial and cytosolic malate dehydrogenase from *Phytophthora infestans*[J]. Mycological Research, 2009, 113: 771-781.
- [21] TREJO F, COSTA M, BUSQUETS M, et al. Cloning, sequencing and functional expression of a DNA encoding pig cytosolic malate dehydrogenase: purification and characterization of the recombinant enzyme[J]. Gene, 1996, 172: 303-308.
- [22] REPETTO Y, HELLMAN U, CAZZULO J J, et al. Purification and partial characterization of the cytosolic malate dehydrogenase from protoscolices of *Echinococcus grunulosus*[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1995, 72: 247-251.
- [23] 高亚鹏,苏荣,梁建荣,等.绿豆酸性磷酸酶的分离纯化和部分性质研究[J].中国粮油学报,2011,26(5):92-96.
- [24] YU Ding, QING Huma. Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat[J]. Biochimie, 2004, 86: 509-518.