

黄颡鱼肝脏胞质中 NADP 依赖性的异柠檬酸 脱氢酶 (IDPc) 的分离纯化和酶学性质

卓梅琴, 谭肖英*, 黄超, 胡伟, 朱庆玲

(华中农业大学水产学院,湖北省淡水养殖协同创新中心,湖北 武汉 430070)

摘要:采用 Sephadex G-100 凝胶过滤、DEAE Sepharose 离子交换、Sephadex G-25 凝胶过滤等方法对黄颡鱼肝脏胞质中 NADP 依赖性的异柠檬酸脱氢酶(IDPc)进行纯化,并研究其相关的酶学性质。结果显示, IDPc 的比活力为 7.94 U/mg, 亚基分子量为 36.7 ku。IDPc 活性最大时的 pH 和温度分别为 8.0 和 65 °C, 活化能为 81.33 kJ/mol, 底物米氏常数 KmNADP 和 KmIC 分别为 0.056 和 0.175 mmol/L, 底物最大反应速率 VmNADP 和 VmIC 分别为 9.04 和 10.51 U/mg, 催化效率 KcatNADP 和 KcatIC 分别为 0.16 和 0.06 min/mg, 产物 NADPH 对 IDPc 表现为竞争性抑制, 抑制常数 K_i NADPH 为 0.034 mmol/L。IDPc 的催化作用强烈依赖于金属离子 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} , 没有金属离子存在时反应几乎不进行, 二价金属离子激活 IDPc 的顺序为 $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Zn^{2+} > Ca^{2+} > Cu^{2+}$, Cu^{2+} 几乎不能激活 IDPc 的活性。 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 既是激活剂也是抑制剂, 与其作用浓度有关, Cu^{2+} 基本上对其无影响。通过对 IDPc 系统的酶学性质探讨, 能够为深入研究 IDPc 催化与调节机制奠定基础。

关键词:黄颡鱼; 异柠檬酸脱氢酶(IDPc); 分离纯化; 酶动力学

中图分类号: S 965.1

文献标志码: A

异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, ICD)是糖代谢三羧酸循环中一个重要的关键酶,它能够催化异柠檬酸(isocitric acid, IC)和辅酶 I/辅酶 II ($NAD^+/NADP^+$) 生成草酰琥珀酸和 NADH/NADPH, 草酰琥珀酸在 ICD 的作用下又能迅速脱羧生成 α -酮戊二酸, ICD 是一种具有脱氢和脱羧双重能力的酶^[1]。

根据辅酶特异性, 异柠檬酸脱氢酶可分为 NAD-ICD (EC. 1. 1. 1. 41) 和 NADP-ICD (EC. 1. 1. 1. 42), 前者仅存在于线粒体中, 主要功能是参与三羧酸循环; 后者以 $NADP^+$ 为辅酶, 既存在于线粒体也存在于胞质中^[2], 其中胞质中的 NADP-ICD (IDPc) 主要作用是产生 NADPH, NADPH 对生物体的能量代谢、脂类生物合成以及抗氧化胁迫起重要作用^[3-4]。IDPc 广泛存在于肝脏、心脏、骨骼肌、肾脏、肾上腺以及血小板和

红细胞等组织细胞中, 其中以肝脏中的含量最高, 当肝细胞发生病变时, IDPc 活性会发生显著性的变化, 检测 IDPc 的活性能较准确地反映出肝细胞病变程度, 因而被广泛应用于医学研究^[5-9]。

目前, 关于 IDPc 的分离纯化和动力学的研究在哺乳动物^[10-13]、植物^[14-15]、微生物^[16-18] 中都有过相关报道, 在鱼类中仅见狼鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[19]。黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 是我国长江流域的一种重要鱼类, 其肉味鲜美, 营养价值高, 已引起广大养殖户浓厚的兴趣, 近年来黄颡鱼的养殖规模逐年扩大, 高密度的养殖模式导致黄颡鱼肝脏病变现象日益严重, 基于 IDPc 在肝病中的应用, 本实验直接从黄颡鱼肝脏中分离出 IDPc 并对其进行纯化, 通过对其进行系统的酶动力学性质分析, 为深入研究该酶的催化及调控机制奠定基础。

收稿日期:2014-03-03 修回日期:2014-06-23

资助项目:国家自然科学基金(31001101);中央高校基本科研业务经费(52204-06086)

通信作者:谭肖英, E-mail:txy7933@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本实验所用的凝胶购买于瑞典 Pharmacia 公司,部分化学药品如 2-巯基乙醇(2-ME)、辅酶 II (NADP⁺)、还原型辅酶 II (NADPH) 和异柠檬酸(IC)购买于美国 Sigma 公司,SDS-PAGE 试剂盒以及考马斯亮蓝检测蛋白试剂盒购买于南京建成科技有限公司,其余试剂全部为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验鱼暂养

从华中农业大学菜市场购买规格为(100 ± 10)g 的健康、无伤的黄颡鱼 60 尾,平均分成 3 组,静水暂养于华中农业大学水产学院校内实验基地的室内水族箱(容积 300 L)中,每缸 20 尾,每天分别按照饱食法投喂湖北海大的商业膨化饲料,使黄颡鱼的生理条件保持相对稳定,暂养 2 周。养殖过程中水体溶氧 > 5.4 mg/L, pH 7.0 ~ 8.4, 氨氮含量 0.030 ~ 0.064 mg/L, 养殖水温(24 ± 5)℃。实验时间为 2013 年 3 月底—5 月底。

1.3 取样

暂养实验结束并停饲 24 h 后,从每个水族缸随机取 3 ~ 4 尾实验鱼,每 10 尾为 1 组。在冰上解剖鱼体,分离出肝脏组织,每 10 尾鱼的肝脏放入同一袋中进行标记和编号。分离的肝组织放入 -80℃ 冰箱贮存。

1.4 分离纯化步骤

从 -80℃ 冰箱中取出一袋肝脏,称取 10 g 左右,用 buffer A(主要包括 10 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L 2-ME 和 1 mmol/L EDTA, pH 7.85)解冻,清洗 3 次,除去血液等其他杂质。用剪刀稍微剪碎,装入匀浆器中,用 36 mL buffer A 将肝脏匀浆,所得的浆液在 4℃、100 000 × g 下离心 60 min。将所得上清液(24 mL)分 3 次上样(每次上样 8 mL,待吸光值降到最低值时再进行第 2 次上样)到 Sephadex G-100 凝胶层析柱(1.6 cm × 50 cm)中,控制流速 0.3 mL/min,每 5 min 收集 1 管,将酶活性大于 2.5 U/mL 的收集管收集起来。所得酶液全部上样到 DEAE-层析柱(1.6 cm × 10 cm)上,先用 buffer A 将不能结合到柱上的杂蛋白全部洗脱掉,直到 OD 值降到 0.03 以下,再改用 10 ~ 200 mmol/L NaCl 进行线性梯度洗脱,每 5 min 收集 1 管,将酶活大于 2.5 U/mL 的收集管收集起来。再将所得酶液分 6 次上样(每次上样 3 mL)到 G-25 层析柱(1.0 cm × 30 cm)中,每 3

min 收集 1 管,将酶活大于 2.0 U/mL 的收集管收集起来。所得的酶液再全部上样到另一 DEAE 层析柱(1.6 cm × 10 cm)中,同样用 buffer A 洗脱至 OD 值降到 0.03,采用 175 ~ 195 mmol/L NaCl 阶段洗脱,收集酶活性大于 3.0 U/mL 的收集管。

1.5 酶活性的测定

酶活的测定参考 Carlier 等^[20]的方法。在 25℃,以 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、10 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L NADP⁺、1 mmol/L IC 为反应体系,最后加入适量的酶液启动反应。在 340 nm 下,通过检测产物 NADPH 的变化来确定酶活力,以酶反应最开始 1 min 内的线性变化确定酶的反应速率。酶活性的定义:每分钟产生 1 μmol/L NADPH 为 1 个酶活单位 U。酶蛋白浓度采用考马斯亮蓝法测定^[21]。

1.6 SDS-PAGE 检测蛋白

采用 Laemmli^[22]的 SDS-PAGE 法检测 IDPc 亚基分子量和分离纯度。

1.7 pH、温度对酶活性的影响

25℃下,分别用不同 pH(4 ~ 10)的 100 mmol/L Tris-buffer,检测酶的活性,确定 IDPc 活性最高时对应的 pH。

在上述酶活性最高对应的 pH 下,分别在不同温度(25 ~ 85)℃下测定酶的活性,确定温度对酶活性的影响。

为了研究温度对酶稳定性的影响,分别将酶液置于不同的温度下(0、25、35、45℃)孵育,每隔 20 min 测定其活力。

1.8 底物动力学参数

采用 Lineweaver 等^[23]的作图法测定底物米氏常数 Km 和 Vm 值。

固定 IC 浓度 1 mmol/L,分别在 0.02 ~ 0.2 mmol/L NADP⁺浓度下测定酶反应初速率 V。采用 Lineweaver-Burk 方法作图得出 KmNADP 和 VmaxNADP,同时计算出催化效率 KcatNADP (Vmax/Km);固定 NADP⁺浓度 0.2 mmol/L,分别在不同 IC 浓度(0.25 ~ 1 mmol/L)下测定酶反应速率 V。采用 Lineweaver-Burk 方法作图得出 KmIC 和 VmaxIC,同时计算出催化效率 KcatIC。

1.9 产物 NADPH 的抑制作用

设置反应体系中刚开始 NADPH 的浓度为 0、0.01、0.015 和 0.02 mmol/L, NADP 浓度分别为 0.02 ~ 0.2 mmol/L,按照矩阵组合添加,并且使得整个反应体系中 IC 处于饱和浓度 1 mmol/L,测得酶反应速率 V。根据 Lineweaver-Burk 作图方法^[23]判定

NADPH 的抑制类型并求得抑制常数 K_i NADPH。

1.10 二价金属离子对酶活性的影响

以二价金属离子的氯化物为载体,分别向反应体系中添加不同浓度的(10、1、0.1 mmol/L)的 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等二价金属离子,并测定相应的酶活性大小,研究不同浓度不同金属离子对 IDPc 活性的影响。

为了探究其他金属离子对反应体系中 Mg 的催化作用是促进还是抑制,在原反应体系中添加 10

mmol/L Mg^{2+} ,再分别向反应体系中添加不同浓度(10、1、0.1 mmol/L)的 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等二价金属离子,并测定其活性。

2 结果

2.1 分离纯化结果

通过 4 步纯化洗脱,结果显示, IDPc 比活力为 7.94 U/mg、回收率为 26.7%、纯化倍数为 42.5(图 1),各参数见表 1。SDS-PAGE 检测得到

表 1 黄颡鱼肝脏中 IDPc 的分离纯化参数
Tab.1 Purification of IDPc from yellow catfish liver

纯化步骤 purification steps	体积/ mL volume	酶活/ (U/mL) activity	总活力/ U t. activity	蛋白浓度/ (mg/mL) protein	总蛋白/ mg t. proteins	比活力/ (U/mg) sp. activity	回收率/ % yield	纯化倍数 purif-fold
100 000 × g 超速离心 ultracentrifugation	24	3.68	88.42	19.75	474.1	0.19	100	1
Sephadex G-100 凝胶过滤 gel chromatography	32	2.62	83.9	11.61	371.66	0.23	94.9	1.2
DEAE Sepharose 离子交换 1 ion-exchange chromatography 1	18	4.02	72.44	3.64	65.47	1.11	81.9	5.9
Sephadex G-25 凝胶过滤 gel chromatography	30	2.36	70.68	0.95	28.61	2.47	79.9	13.2
DEAE Sepharose 离子交换 2 ion-exchange chromatography 2	6	3.94	23.64	0.5	2.98	7.94	26.7	42.5

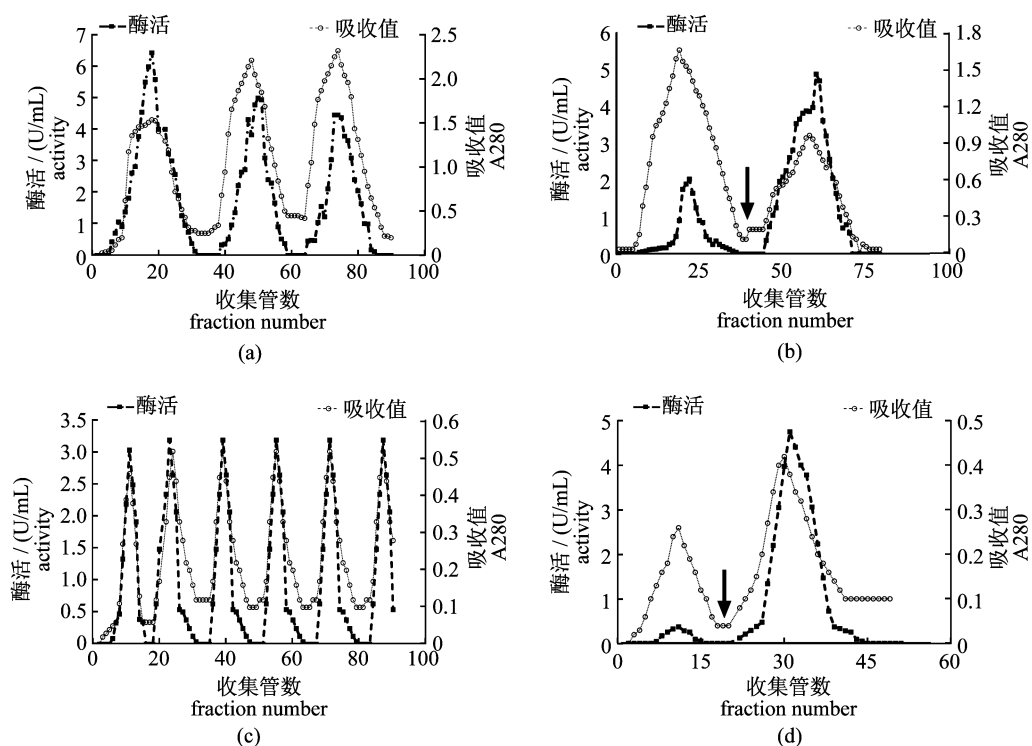


图 1 洗脱图谱

(a) Sephadex G-100 凝胶过滤洗脱图谱; (b) 第一次 DEAE Sepharose 离子交换层析图谱; (c) Sephadex G-25 凝胶过滤洗脱图谱; (d) 第二次 DEAE Sepharose 离子交换层析图谱; (b) 和 (d) 图中的箭头表示开始用 NaCl 进行洗脱

Fig.1 Elution profile

(a) gel chromatography on Sephadex G-100; (b) elution profile from DEAE Sepharose chromatography; (c) gel chromatography on Sephadex G-25; (d) elution profile from DEAE Sepharose chromatography; the arrows in (b), (d) indicate the start of linear gradient NaCl in buffer

单一目的条带(图2),利用蛋白分子量对数-迁移率标准曲线作图法,计算得到 IDPc 亚基分子量为 36.7 ku(图3)。

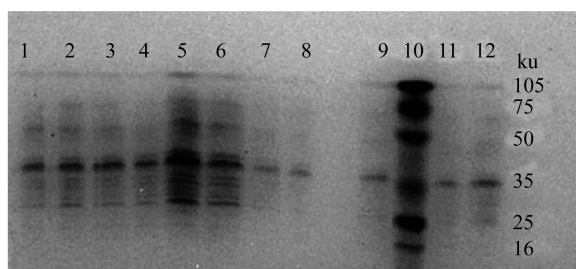


图2 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

1~4 泳道为 Sephadex G-25 凝胶过滤后收集的酶液; 5~6 泳道为第一次 DEAE Sepharose 洗脱收集的酶液; 7~9, 11~12 泳道为第二次 DEAE Sepharose 洗脱收集的酶液; 10 泳道为蛋白 Marker, 从上到下每一条带分子量为 105, 75, 50, 35, 25 和 16 ku

Fig. 2 SDS-PAGE photograph

lane(1-4), enzyme collected from Sephadex G-25 column; lane(5-6), enzyme from first time DEAE Sepharose chromatography; lane(7-9, 11-12), finally enzyme eluted from the second DEAE Sepharose chromatography; lane 10, standard proteins, the MW of the band from top to bottom is 105, 75, 50, 35, 25 and 16 ku, respectively

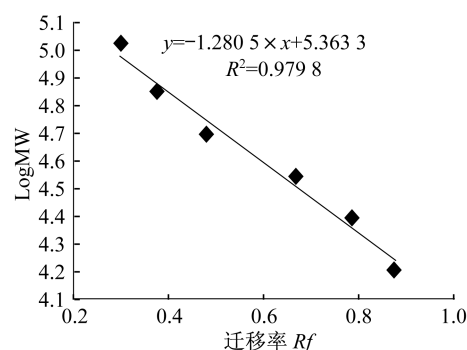


图3 聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白分子量的对数和迁移率标准曲线

Fig. 3 Standard Rf-LogMW graph using SDS-PAGE

2.2 温度、pH 的影响

IDPc 在温度为 65 °C、pH 为 8.0 时,酶反应速率最高,在温度为 0 °C 时最稳定,活化能为 81.33 kJ/mol(图4)。虽然在 65 °C 时酶反应速率最高,但由于鱼类生存的适宜温度大都在 20~30 °C,因此本实验中动力学以及其他参数都是在生理温度 25 °C 下测定。

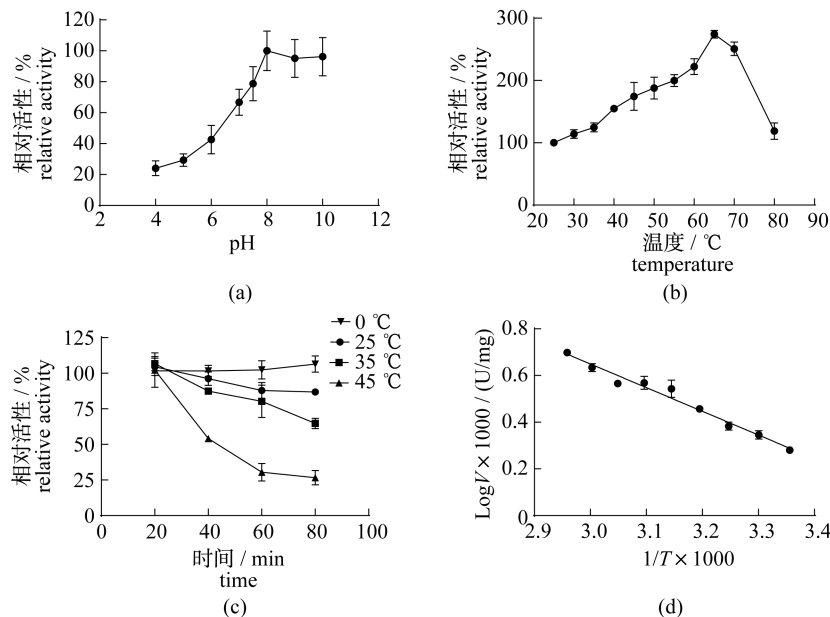


图4 温度(T)和 pH 对酶活性的影响

(a) 25 °C 条件下,不同 pH 对酶活性的影响; (b) pH = 8 条件下,不同温度对酶活性的影响; (c) pH = 8 条件下,温度对酶稳定性的影响; (d) 阿尔尼乌斯曲线求酶的活化能,温度(T)为绝对温度,曲线斜率(k) = -活化能(Ea) / -2.303 × R, R 等于 8.314,为气体常数

Fig. 4 Effects of pH and temperature on IDPc activity

(a) effect of pH on IDPc activity under 25 °C temperature; (b) effect of temperature on IDPc activity under pH = 8; (c) effect of temperature on IDPc stability under pH = 8; (d) the Arrhenius plot to determine Ea value; the slope of the line = -Ea / -2.303 × R, where R is the gas constant equal to 8.314

2.3 底物动力学参数

利用 Lineweaver-Burk 作图结果显示, K_m NADP 和 V_m NADP 分别为 0.056 mmol/L 和 9.04 U/mg, K_m IC 和 V_m IC 为 0.175 μ mol/L 和

10.51 U/mg, 催化效率 K_{cat} NADP 和 K_{cat} IC 为 0.16 和 0.06 min/mg(图 5); NADPH 的抑制类型为竞争性抑制, 抑制常数 K_i NADPH 为 0.034 mmol/L(图 6); 相关参数见表 2。

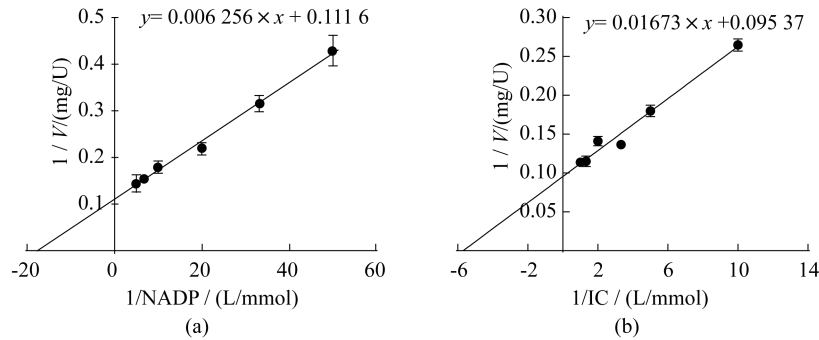


图 5 双倒数作图法求底物 NADP 和 IC 的 K_m 和 V_m 值

(a) 固定底物 IC 浓度为 1 mmol/L, 不同 NADP(0.02 ~ 0.2 mmol/L) 浓度下的酶反应速率; (b) 固定底物 NADP 浓度为 0.2 mmol/L, 不同 IC(0.1 ~ 1.0 mmol/L) 浓度下的酶反应速率

Fig. 5 Lineweaver-Burk graph to determine K_m and V_m values of the substrates

(a) lineweaver-Burk graph with varied NADP contents of (0.02 ~ 0.2) mmol/L, respectively, at the fixed IC (1 mmol/L); (b) lineweaver-burk graph with the varied IC contents of (0.1 ~ 1.0) mmol/L, respectively, at the fixed NADP(0.2 mmol/L)

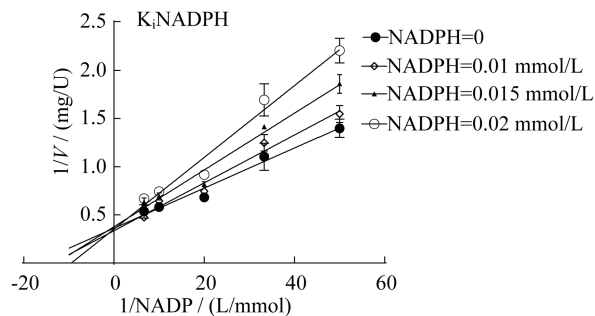


图 6 双倒数作图法判断 NADPH 抑制类型并求得抑制常数 K_i NADPH

Fig. 6 Lineweaver-Burk graph to determine inhibitive type and inhibitive constant of NADPH

表 2 底物 NADP 和 IC 动力学参数
Tab.2 Kinetic parameters of IDPc

参数 parameters	数值 \pm 标准差 value \pm SD
K_m NADP ⁺ /(mmol/L)	0.056 \pm 0.00
K_m 6PGA/(mmol/L)	0.175 \pm 0.00
V_m NADP ⁺ /(U/mg)	9.04 \pm 1.31
V_m 6PGA/(U/mg)	10.51 \pm 0.68
K_{cat} NADP ⁺ /(min/mg)	0.16 \pm 0.03
K_{cat} 6PGA/(min/mg)	0.06 \pm 0.00
K_i NADPH/(mmol/L)	0.034 \pm 0.01

2.4 二价金属离子对酶活性的影响

Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 能够有效提高催化效率(图 7), Mn^{2+} 的催化效率明显强于 Mg^{2+} , 二价金属离子激活 IDPc 的顺序为 $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Zn^{2+} > Ca^{2+} > Cu^{2+}$, Cu^{2+} 几乎不能激活 IDPc 的活性。 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 既是激活剂也是抑制剂, 与其作用浓度有关。 Cu^{2+} 对 IDPc 活性无显著影响(表 3)。

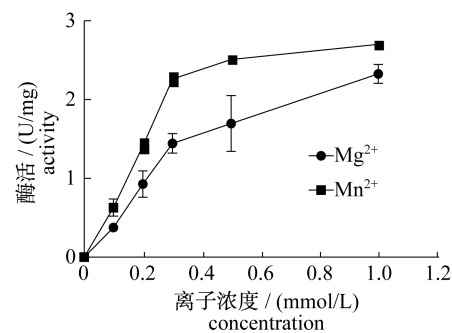


图 7 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 催化活性的比较

Fig. 7 The differences of the enzymatic activities among different Mg^{2+} / Mn^{2+} concentrations

3 讨论

ICD 是三羧酸循环的限速酶, 对能量和物质代谢的调节具有重要作用, 曾被国际上公认是研究蛋白质结构与功能关系、酶的催化与调节机制、蛋白质分子进化机制的最好模型之一^[24]。

表3 不同金属离子和浓度对 IDPc 酶活性的影响
 Tab.3 Relative activity of IDPc with different metal ions and concentration %

添加各离子的浓度 differentiation ions concentration	初始 Mg ²⁺ 浓度 initial Mg ²⁺ concentration					
	[Mg ²⁺] = 0 mmol/L			[Mg ²⁺] = 10 mmol/L		
	10 mmol/L	1 mmol/L	0.1 mmol/L	10 mmol/L	1 mmol/L	0.1 mmol/L
Mg ²⁺	100.0 ± 3.8	88.7 ± 6.5	14.4 ± 1.6	92.2 ± 5.1	108.1 ± 4.7	109.9 ± 2.4
Mn ²⁺	109.1 ± 3.1	103.0 ± 3.1	24.0 ± 4.1	147.6 ± 16.6	146.6 ± 4.1	145.3 ± 6.8
Ca ²⁺	12.2 ± 6.4	6.7 ± 1.0	0	64.5 ± 3.0	85.2 ± 3.5	105.1 ± 4.4
Zn ²⁺	35.6 ± 9.7	5.9 ± 0.8	0	18.2 ± 3.8	27.7 ± 0	113.2 ± 13.2
Cu ²⁺	0	0	0	104.9 ± 2.4	105.4 ± 10.1	115.7 ± 7.6

注:反应体系中加入 10 mmol/L MgCl₂ 的酶活为相对活性 100%,其余均以此对照测得相对酶活

Notes: the reaction system contains 10 mmol/L Mg²⁺ is taken as control with the relative activity of 100%

本实验通过常规的凝胶过滤和离子交换层析等方法,进行了 2 d 的 IDPc 蛋白纯化过程。所得目的蛋白经过 SDS-PAGE 检测为单一条带,其亚基分子量为 36.7 ku。部分研究报道 IDPc 由 2 个亚基组成^[10-11,20,25-26],也有报道认为 IDPc 是由单个亚基组成^[13,27],甚至在绿豆中还存在四聚体^[14]。不同组织中亚基的分子量也存在一定的差异,例如,在猪肝脏中为 37.5 ku^[10]、在公牛心脏线粒体中为 45 ku^[11]、在兔肾上腺中为 50 ku^[12]、在鼠肝脏中为 45 ku^[13]、在单细胞藻青菌中为 54 ku^[25]、在土豆中为 46 ku^[26]、在猪心脏中为 58 ku^[27]、在蟋蟀翅膀中为 46.3 ku^[28],说明在不同物种中,相同的酶其亚基结构还是存在差异,本实验结果与猪肝脏^[10]的报道最接近。

温度和 pH 值是影响酶活性和催化效率最重要的两个外界条件,温度和 pH 的不适宜都会导致酶活性不同程度的降低,甚至失活。本研究表明,25 °C 时,黄颡鱼 IDPc 的最适 pH 为 8.0,略偏碱性,这与在不同动物组织研究中最适 pH 范围为 7.0~8.0 一致^[28-29]。IDPc 的最适 pH 可能与该酶中催化残基的解离常数有关,这些残基在异柠檬酸氧化脱羧过程中充当初始的质子给予体和最后的质子接受体^[18]。IDPc 的反应初速率随着温度的增加而增加,当温度大于 65 °C 时,反应速率开始下降,并且下降速度很快。然而,温度越高,虽然 IDPc 的反应初速率增大,但 IDPc 的稳定性却变差,在 45 °C 的水浴中孵育之后, IDPc 很快就失活了,但在 0 °C 冰上孵育的 IDPc 却能保持良好的稳定性。Musa^[29] 的研究也发现 IDPc 在 45 和 50 °C 中孵育 15 min 后基本上丧失了 90% 和 98% 的活性,但是在 -20 °C 条件下能保持稳定 1 个月,说明低温可以保持 IDPc 的良好活性,但高

温易导致 IDPc 失活,为保证实验过程中酶具有较好的活性状态,后续整个实验过程中,完全将酶液保存于冰上。本实验通过温度与酶反应初速率的关系,利用阿尔尼乌斯曲线,求得活化能为 81.33 kJ/mol,远远低于兔肾上腺中的 256.60 kJ/mol^[12],表明同种酶的活化能在不同物种间存在显著差异。

底物和产物是影响酶促反应过程的 2 个基本因素,本实验中通过双倒数曲线求得底物 KmNADP 和 KmIC 分别为 0.056 和 0.175 mmol/L, KmIC 大于 KmNADP 说明 NADP⁺ 对酶的亲和力强于 IC。这与在单细胞藻青菌^[25] 和蟋蟀翅膀^[28] 中的研究结果一致,但是和狼鲈肝脏的研究结果相反^[19]。黄颡鱼 IDPc 的 VmNADP 和 VmIC 分别为 9.04 和 10.51 U/mg。底物的催化效率 KcatNADP 和 KcatIC 分别为 0.16 和 0.06 min/mg,说明 NADP⁺ 的催化效率高于 IC。产物 NADPH 对酶的催化具有抑制作用,抑制类型为竞争性抑制,抑制常数为 0.035 mmol/L,该抑制常数远远低于在绿豆中的 0.13 mmol/L^[15],但是远远高于猪肝脏中的 0.000 4 mmol/L^[10]。

金属离子既可以是机体内酶的辅酶,也可以作为一种毒物破坏酶或者受体上的具有生物学功能的硫醇基团,从而导致酶的失活,继而引发细胞死亡^[30-31],这种现象在 IDPc 中尤为显著, IDPc 是一种强烈依赖金属离子的酶,在无金属辅酶存在的情况下基本没有活性。在二价金属离子 Mn²⁺、Mg²⁺ 存在时具有很高的活性。其中 Mn²⁺ 的活性高于 Mg²⁺,并且当 Mn²⁺ 浓度达到 0.5 mmol/L 之后,酶活增加的趋势趋于平缓,而 Mg²⁺ 则在 1 mmol/L 浓度时未见平缓趋势, Srivastava 等^[15] 在绿豆研究中发现,当 Mn²⁺ 浓度

为 0.5 mmol/L、 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L,金属离子与酶的结合达到饱和。从表 3 中可以看出,当最初反应中不加入 Mg^{2+} 时,二价金属离子激活 IDPc 的顺序为 $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Zn^{2+} > Ca^{2+} > Cu^{2+}$, Cu^{2+} 几乎不能激活 IDPc 的活性, Srivastava 等^[15] 在绿豆的研究中也有类似的报道;而当反应中加入 10 mmol/L Mg^{2+} 时,再加入其他相应浓度的金属离子时,可以看出高浓度的 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 能够强烈抑制 IDPc 的活性,说明 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 既是抑制剂也是激活剂,其作用方式存在浓度效应, Yasutake 等^[32-33] 和 Xu 等^[34] 在研究 IDPc 的结构和功能时也发现了同样的现象。IDPc 的底物实际上是金属辅酶(Mg^{2+}/Mn^{2+})和 IC 形成复合物后再与酶进行催化反应^[35],当 Ca^{2+} 取代 Mg^{2+} 后则产生了金属离子配位的变化,引起活性中心底物变性进而导致酶丧失活性^[36]。本实验中高浓度的 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 之所以能够抑制酶的活性,很可能是因为 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 与 Mg^{2+} 竞争同 IC 的结合,引起活性中心的底物变性,导致该酶活性下降;而对于 Cu^{2+} ,在金属 Mg^{2+} 存在的条件下, Cu^{2+} 几乎不影响该酶的活性,说明 Cu^{2+} 很可能不能与 IDPc 结合,因而既不能激活也不能抑制 IDPc 的活性。

参考文献:

- [1] Sun L, Sun T T, Lavker R M. Identification of a cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase that is preferentially expressed in bovine corneal epithelium a corneal epithelial crystallin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (24): 17334 - 17341.
- [2] Jennings G T, Sadleir J W, Stevenson P M. Purification and properties of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from the corpus luteum [J]. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 1990, 1034(2): 219 - 227.
- [3] Kirsch M, De Groot H. NADPH, a directly operating antioxidant? [J]. *The FASEB Journal*, 2001, 15(9): 1569 - 1574.
- [4] Nakamura H. Thioredoxin and its related molecules: update 2005 [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2005, 7(5-6): 823 - 828.
- [5] Geng Y L, Yang L X. The determination and clinical value of isocitrate dehydrogenase [J]. *Journal of Lanzhou Medical College*, 1992, 18(4): 241 - 244. [耿蕴兰, 杨林西. 血清异柠檬酸脱氢酶测定及其临床意义. 兰州医学院学报, 1992, 18(4): 241 - 244.]
- [6] Chi B R, Ren X B, Guo X L, et al. The determination and clinical value of isocitrate dehydrogenase in different hepatopath [J]. *Journal of Norman Bethune University of Medical Science*, 1996, 22(6): 71 - 72. [迟宝荣, 任秀宝, 郭晓林, 等. 不同肝病患者血清异柠檬酸脱氢酶测定及临床意义. 白求恩医科大学学报, 1996, 22(6): 71 - 72.]
- [7] Zhao D T. The value of serum isocitrate dehydrogenase to the acute hepatitis diagnosed [J]. *Journal of Lanzhou Medical College*, 1996, 22(1): 43 - 44. [赵大同. 血清异柠檬酸脱氢酶对急性肝炎的诊断价值. 兰州医学院学报, 1996, 22(1): 43 - 44.]
- [8] Meng X L. The application of isocitrate dehydrogenase and leucine aminopeptidase in the hepatopathy [J]. *Chinese Journal of Misdiagnostics*, 2004, 4(6): 913 - 914. [孟宪玲. 异柠檬酸脱氢酶及亮氨酸氨基肽酶在肝病中的应用. 中国误诊学杂志, 2004, 4(6): 913 - 914.]
- [9] Fan J, Zhang X S, Yuan Y H, et al. The methodology research of isocitrate dehydrogenase [J]. *Tianjin Medical Journal*, 2008, 36(9): 719 - 721. [樊晶, 张孝山, 袁玉华等. 异柠檬酸脱氢酶检测方法学研究. 天津医药, 2008, 36(9): 719 - 721.]
- [10] Illingworth J A, Tipton K F. Purification and properties of the nicotinamide - adenine dinucleotide phosphate-dependent isocitrate dehydrogenase from pig liver cytoplasm [J]. *Biochemical Journal*, 1970, 118(2): 253 - 258.
- [11] Macfarlane N, Mathews B, Dalziel K. The purification and properties of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from ox-Heart mitochondria [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1977, 74(3): 553 - 559.
- [12] Strumilo S A, Viktorovich N M, Vinogradov V B. Purification and various properties of hyaloplasmic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from the rabbit adrenal gland [J]. *Biokhimiia*, 1984, 49(2): 240 - 246.
- [13] Fatania H, al-Nassar K E, Sidhan V. Purification and partial characterisation of NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase from rat liver cytosol [J]. *FEBS Letters*, 1993, 320(1): 57 - 60.
- [14] Srivastava P K, Pathak K, Prakash O. A study of NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase from Germinating Mung Bean (*Vigna radiata*) [J]. *Journal*

- of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2004, 13 (2): 145 - 148.
- [15] Srivastava P K, Pathak K, Singh S. Kinetics of inactivation of NADP-linked isocitrate dehydrogenase from germinating mung bean (*Vigna radiata*) [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2010, 19(2): 251 - 254.
- [16] Barrera C R, Jurtshuk P. Characterization of the highly active isocitrate (NADP⁺) dehydrogenase of (*Azotobacter vinelandii*) [J]. Biochimica Biophysica Acta Enzymology, 1970, 220(3): 416 - 429.
- [17] Kanao T, Kawamura M, Fukui T, et al. Characterization of isocitrate dehydrogenase from the green sulfur bacterium (*Chlorobium limicola*) [J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269 (7): 1926 - 1931.
- [18] Stokke R, Madern D, Fedøy A E, et al. Biochemical characterization of isocitrate dehydrogenase from (*Methylococcus capsulatus*) reveals a unique NAD-dependent homotetrameric enzyme [J]. Archives of Microbiology, 2007, 187(5): 361 - 370.
- [19] Medina-Puerta M M, Gallego-Iniesta M, Garrido-Pertierra A. NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from bass (*Dicentrarchus labrax* L.) liver [J]. Biochemistry International, 1988, 17 (3): 489 - 498.
- [20] Carlier M F, Pantaloni D. NADP-linked isocitrate dehydrogenase from beef liver. Purification, quaternary structure and catalytic activity [J]. European Journal of Biochemistry, 1973, 37 (2): 341 - 354.
- [21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248 - 254.
- [22] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680 - 685.
- [23] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants [J]. Journal of the American Chemical Society, 1934, 56: 658 - 666.
- [24] Zhu G P, Huang E Q, Zhao H J. Structure and function of NADP-isocitrate dehydrogenase [J]. Journal of Anhui Normal University: Natural Science Edition, 2007, 30(3): 366 - 371. [朱国萍, 黄恩启, 赵昂军. NADP-异柠檬酸脱氢酶的结构与功能. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2007, 30(3): 366 - 371.]
- [25] Muro-Pastor M I, Florencio F J. Purification and properties of NADP-isocitrate dehydrogenase from the unicellular cyanobacterium (*Synechocystis*) sp. PCC 6803 [J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 203(1 - 2): 99 - 105.
- [26] Gallardo F, Gálvez S, Gadal P, et al. Changes in NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase during tomato fruit ripening [J]. Planta, 1995, 196 (1): 148 - 154.
- [27] Colman R F. Substrate independence of molecular weight of triphosphopyridine nucleotide-specific isocitrate dehydrogenase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1972, 247(20): 6727 - 6729.
- [28] Zera A J, Newman S, Berkheim D, et al. Purification and characterization of cytoplasmic NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, and amplification of the NADP⁺-IDH gene from the wing-dimorphic sand field cricket, *Gryllus firmus* [J]. Journal of Insect Science, 2011, 11(53): 1 - 21.
- [29] Zarga M H A, Shikara M. NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from human kidney mitochondria [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(75): 17070 - 17080.
- [30] Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Copper ions differ from other thiol reactive metal ions in their effects on the concentration and redox status of thiols in Hela cell cultures [J]. Toxicology, 1997, 117(2 - 3): 89 - 97.
- [31] Shin S W, Kil I S, Park J W. Cytosolic NADP(+) -dependent isocitrate dehydrogenase regulates cadmium-induced apoptosis [J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 79(7): 1072 - 1080.
- [32] Yasutake Y, Watanabe S, Yao M, et al. Structure of the monomeric isocitrate dehydrogenase: evidence of a protein monomerization by a domain duplication [J]. Structure, 2002, 10(12): 1637 - 1648.
- [33] Yasutake Y, Watanabe S, Yao M, et al. Crystal structure of the monomeric isocitrate dehydrogenase in the presence of NADP⁺: insight into the cofactor recognition, catalysis, and evolution [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (38): 36897 - 36904.
- [34] Xu X, Zhao J Y, Xu Z, et al. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279 (32): 33946 - 33957.
- [35] Olano J, de Arriaga D, Busto F, et al. Kinetics and thermostability of NADP-isocitrate dehydrogenase

- from *Cephalosporium acremonium* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61 (6): 2326 - 2334.
- [36] Stoddard B L, Dean A, Koshland D E Jr. Structure of isocitrate dehydrogenase with isocitrate, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, and calcium at 2.5-Å resolution: a pseudo-Michaelis ternary complex [J]. Biochemistry, 1993, 32(36): 9310 - 9316.

Purification and properties of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependent isocitrate dehydrogenase (IDPc) from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) hepatic cytoplasm

ZHUO Meiqin, TAN Xiaoying*, HUANG Chao, HU Wei, ZHU Qingling

(Fishery College, Huazhong Agricultural University, Hubei Freshwater Aquaculture

Collaborative Innovative Center, Wuhan 430070, China)

Abstract: Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent Isocitrate Dehydrogenase (IDPc) is an important enzyme essential for survival of all organisms. Many studies have been conducted to isolate IDPc and explore its kinetic parameters in mammals, plants and microorganisms. However, in fish, the related information is very scarce. The aim of the study is to purify and characterize IDPc from yellow catfish hepatic cytoplasm, which will provide some crucial information on the catalytic and regulatory mechanism of the enzyme in liver of yellow catfish. The purification processes include permeation chromatography on Sephadex G-100 gel, chromatographic adsorption by DEAE Sepharose, permeation chromatography on Sephadex G-25 gel and finally chromatographic adsorption by DEAE Sepharose again. The specific IDPc activity is 7.94 U/mg, and its molecular weight after SDS polyacrylamide slab gel electrophoresis is 36.7 ku. The optimum pH, and temperature for the enzyme are 8.0 and 65 °C respectively. Using Arrhenius plots, the enzyme has the activation energy of 81.33 kJ/mol. The Km values of the substrates NADP⁺ and IC are 0.056 mmol/L and 0.175 mmol/L, respectively. The Vmax values of IDPc with NADP⁺ and IC as the substrates are 9.04 U/mg and 10.51 U/mg, respectively. The enzyme of IDPc is inhibited by NADPH in a competitive manner with the K_i value of 0.034 mmol/L. The activity of IDPc is greatly dependent on the binding of divalent metal ions with the active order of Mn²⁺ > Mg²⁺ > Zn²⁺ > Ca²⁺ > Cu²⁺. Ca²⁺ and Zn²⁺ are both the activator and inhibitor of IDPc, however, Cu²⁺ showed no effects on the enzyme. The comprehensive information of enzymatic properties may help to better understand the mechanism of catalysis and regulation of IDPc in fish.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; IDPc; purification; kinetic characterization

Corresponding author: TAN Xiaoying. E-mail: txy7933@163.com