

基于遗传算法的光合细菌过氧化物酶电泳 分析方法的建立

牛红军¹ 李飞莹² 仇丽霞² 杨官娥^{1*}

(1. 山西医科大学药学院 山西 太原 030001)

(2. 山西医科大学卫生统计学教研室 山西 太原 030001)

摘要: 建立光合细菌中过氧化物酶的酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳(A-PAGE)分析方法。以电泳图谱的谱带数和灰度为指标,运用正交试验和遗传算法对该方法的电泳条件进行优化。实验结果表明,当凝胶中 Triton X-100 含量为 0.31%、菌体破碎时间为 19 min、样品中 Triton X-100 含量为 0.79%时,可获得清晰的沼泽红假单胞菌过氧化物酶图谱;当凝胶中 Triton X-100 含量为 0.27%、菌体破碎时间为 16 min、样品中 Triton X-100 含量为 0.76%时,可获得清晰的球形红细菌过氧化物酶图谱。本方法为光合细菌中过氧化物酶的分析提供了一种新的、简单、快速的手段。

关键词: 光合细菌, 过氧化物酶同工酶, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 遗传算法

Establishment of Gel Electrophoresis for the Analysis of Peroxidases in Photosynthetic Bacteria Based on Genetic Algorithm

NIU Hong-Jun¹ LI Fei-Ying² QIU Li-Xia² YANG Guan-E^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

(2. Department of Health Statistic, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract: To establish the acid polyacrylamide gel electrophoresis (A-PAGE) analyzing method of peroxidase isoenzymes in photosynthetic bacteria. According to the number and the grey scale of bands, the conditions of the A-PAGE were optimized by the orthogonal design and the genetic algorithm. The results indicated that when the Triton X-100 concentration in the gels was 0.31%, the ultrasonic time was 19 min, the Triton X-100 concentration in the samples was 0.79%, the clear peroxidase isoenzyme zymograms of *Rhodospseudomonas palustris* were obtained, when the Triton X-100 concentration in the gels was 0.27%, the ultrasonic time was 16 min, the Triton X-100 concentration in the samples was 0.76%, the clear peroxidase isoenzyme zymograms of *Rhodobacter sphaeroides* were obtained. The paper set up a simple and rapid method for the analysis of peroxidase isoenzymes in photosynthetic bacteria.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30672621); 山西省自然科学基金项目(No. 2006011099); 山西省科技攻关项目(No. 051081); 山西医科大学博士启动基金项目(No. 03200811); 山西医科大学大学生创新项目(No. 2009146)

*通讯作者: Tel: 86-351-4690143; 信箱: yangguane@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-11-19; 接受日期: 2010-01-14

Keywords: Photosynthetic bacteria, Peroxidase isoenzymes, Polyacrylamide gel electrophoresis, Genetic algorithm

过氧化物酶(Peroxidases, POD)广泛分布于植物、动物、真菌和细菌等生物中,是一类能反映生物遗传特征、生长发育特点、体内代谢及对外界环境适应状况的氧化还原酶。POD以过氧化氢为电子受体,能催化底物发生氧化反应,被广泛应用于生化检测和临床诊断,能高效降解石化、造纸、纺织等行业工业废水中酚类和芳香胺类污染物^[1-3],还可作为造纸工业中生物制浆的漂白剂^[4],有广泛的应用前景。目前,有关植物、真菌中POD的研究和应用较多^[5-6],而细菌中POD的研究报道很少^[7]。光合细菌是地球上最古老的生物之一,光照厌氧和黑暗好氧条件下都能利用有机物进行异养生长,在自然界碳素循环和物质转化中起着重要作用,在环保、农业、医药保健等许多领域中的用途引起人们的重视,已被用于开发药物、保健食品和菌肥等产品^[8-9]。

本研究的试验数据采用全局最优的遗传算法对试验条件进行优化分析,建立一种光合细菌POD酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析方法,为光合细菌中POD的研究提供了一种新的方法,为光合细菌和微生物POD的进一步研究和应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基:光合细菌系紫色非硫菌群红细菌属的沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)、球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*),由山西大学光合细菌研究室分离、鉴定、保藏。

培养基:乙酸钠 1640 mg、酵母膏 1000 mg、CaCl₂·2H₂O 75 mg、EDTA 20 mg、K₂HPO₄ 900 mg、KH₂PO₄ 600 mg、MgSO₄·7H₂O 200 mg、FeSO₄·7H₂O 11.8 mg、(NH₄)₂SO₄ 1320 mg、微量元素 1 mL、去离子水定容至 1 L, pH 7.0。分装于 100 mL 血清瓶, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 25 min。

1.1.2 主要试剂和仪器:丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、甘氨酸、核黄素购自 AMRESKO 公司; Tris、TEMED、Triton X-100 购自 Sigma 公司; β-丙氨酸、联苯胺、乙酸钠等为国产分析纯试剂。DYY-6C 型电泳仪和 DYCZ-24DN 型垂直板电泳槽(北京六一仪器厂)、Y92-IIID 超声波细胞粉碎机(宁

波新芝生物科技公司)、ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)。

1.2 光合细菌培养

实验用器皿和培养基都经过高温灭菌消毒,无菌条件下接入 1/10 体积的光合细菌菌种,光照厌氧培养,培养温度 30°C,光照强度 2500 Lux,培养 3 d 后得光合细菌菌液。

1.3 过氧化物酶提取

将光合细菌菌液以 5000 r/min 离心 30 min,收集菌体,洗涤 2 次,菌体重悬于 0.02 mol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液。超声辅助冻融法破碎菌体,即取 1 mL 菌体悬液,反复冻融 3 次后冰浴中超声破碎适当时间(200 W, 间隔 6 s, 工作 5 s)。在 4°C 条件下, 14000 r/min 离心 15 min,弃沉淀,4°C 冷藏上清液(酶液),供电泳分析用。

1.4 电泳

1.4.1 POD 样品的 PAGE 分离:采用凝胶中添加 Triton X-100 的 A-PAGE 分离 POD 同工酶。分离胶浓度 7%, pH 4.3, 添加适量的 Triton X-100; 浓缩胶浓度 3.75%, pH 6.7, 添加与分离胶中相同浓度的 Triton X-100; 电极缓冲液为 β-丙氨酸-冰乙酸系统, pH 4.5。将 POD 酶液和 40%蔗糖溶液按照 1:1 的比例混合后加入适量 Triton X-100, 上样, 每孔加样 25 μL, 4°C 电泳, 起始电压为 90 V, 样品从浓缩胶进入分离胶后电压改为 120 V。以次甲基蓝做指示剂, 待次甲基蓝泳动至距凝胶板下端 0.5 cm 时停止电泳, 电泳约 2.5 h。

1.4.2 染色与凝胶图像分析:改良联苯胺法^[10]染色, 50 min 后酶带清晰, 用水冲洗, 保存于经脱气的去离子水中。采用 ChemiDoc XRS 凝胶成像系统获取图谱, 以 Total lab 120 软件确定条带, 消除图像背景, 测定灰度值。

1.5 方案设计

1.5.1 正交试验方案设计:根据预试验可知, 碱性电泳法^[11]无法有效分离光合细菌 POD, 见图 1。在高 pH 条件下, 部分 POD 残留于加样孔(见标记 1 和 2), 未进入浓缩胶; 部分 POD 未进入分离胶(见标记 3、4 和 5); 红色类胡萝卜素谱带对 POD 酶谱有干扰(见标记 6、7、8 和 9); 酶谱不清晰, 条带分散, 所以实验改为酸性法。

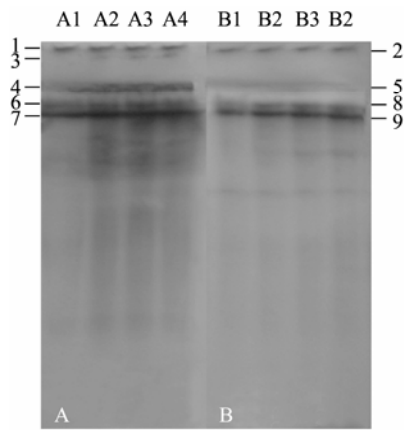


图 1 光合细菌 POD 同工酶碱性电泳法图谱

Fig. 1 The POD isoenzyme zymograms of photosynthetic bacteria by anionic PAGE

注: 分离胶浓度: 7%; 光合细菌破碎时间: 15 min; A: 沼泽红假单胞菌 POD; B: 球形红细菌 POD; A1-A4 和 B1-B4 样品中依次添加 0、0.2%、0.4% 和 0.8% 的 Triton X-100。

Note: The separation gel's concentration: 7%; Ultrasonic time: 15 min; A: POD from *R. palustris*; B: POD from *R. sphaeroides*; The concentrations of Triton X-100 from A1 to A4 and B1 to B4 were 0, 0.2%, 0.4% and 0.8%.

由单因素试验结果可知, 影响光合细菌 POD 电泳效果的主要因素为: 凝胶中 Triton X-100 的含量(A)、超声破碎时间(B)、样品中 Triton X-100 的添加量(C), 对这 3 个因素采用 $L_{16}(4^3)$ 正交表进行试验设计, 因素水平见表 1。

水平 Levels	因素 Factors		
	A (%)	B (min)	C (%)
1	0.0	5	0.0
2	0.2	10	0.2
3	0.4	15	0.4
4	0.8	20	0.8

1.5.2 评分标准: 以泳道中酶带数量和酶带灰度为综合评价指标。其中酶带数量表征酶间的分离效果, 酶带灰度体现酶的聚集程度。每个泳道满分为 100 分。若 POD 同工酶的酶带最多为 n 条, 则每条酶带满分为 $100/n$ 分, 每条酶带得分 $S = k \times (100/n)$ (其中 $k = g/g_{\max}$, g 为酶带灰度, g_{\max} 为同一条酶带中灰度最大的酶带灰度)。每个泳道总得分 $S_t = \sum S$, 即 $S_t = \sum [g/g_{\max} \times (100/n)]$ 。

1.5.3 模型建立方法: 对红假单胞菌电泳得分、球形红细菌电泳得分采用后退法在 $\alpha_{\text{出}} = 0.10$ 的水平

下进行因素筛选, 分别建立评价指标与影响因素的二次型回归模型, 即

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^m \beta_i x_i + \sum_{i=1}^m \beta_i x_i^2 + \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m \beta_{ij} x_{ij} \quad i < j, m \text{ 为因素个数。}$$

因素个数。

1.5.4 遗传算法的参数设置: 以红假单胞菌电泳得分与球形红细菌电泳得分分别为目标函数, 采用二进制编码, 锦标赛选择机制, 初始种群为 $N = 30$, 单点交叉概率 0.9, 单点变异概率 = 0.01, 进化代数 100 代, 运行 10 次, 寻找光合细菌 POD 电泳最佳条件。

1.6 数据的统计学处理

采用 SAS9.1 对正交试验数据进行统计分析, 利用 Matlab2009a 外挂 SGALAB 工具箱 Beta5008, 对实验数据进行遗传算法寻优, 确定电泳法的最佳实验条件。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

光合细菌 POD 同工酶正交试验酶谱见图 2 和图 3。沼泽红假单胞菌 POD 同工酶泳道中酶带最多为 7 条, 即 $n = 7$, 则泳道总得分 $S_t = \sum [g/g_{\max} \times (100/7)]$; 球形红细菌 POD 同工酶泳道中酶带最多为 4 条, 即 $n = 4$, 则泳道总得分 $S_t = \sum [g/g_{\max} \times (100/4)]$ 。实验得分结果见表 2。

2.2 目标函数的模型拟合

2.2.1 红假单胞菌电泳得分的模型拟合: 采用后退回归方法建立红假单胞菌电泳得分的二次型回归模型, 模型 $F = 22.88$ 、 $P < 0.0001$, 模型显著, $R^2 = 91.96\%$,

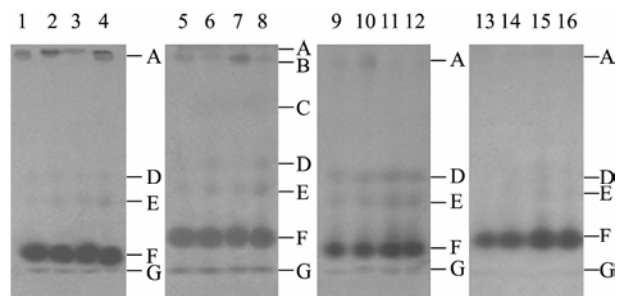


图 2 红假单胞菌 POD 同工酶酸性电泳法正交试验图谱
Fig. 2 The POD isoenzyme zymograms of *R. palustris* by A-PAGE in orthogonal test

注: 1-16: 依照 $L_{16}(4^3)$ 正交表进行的第 1 组至第 16 组正交试验; A-G: 迁移率(R_r)依次增大的 7 条 POD 同工酶。

Note: 1-16: The sixteen tests based on orthogonal test; A-G: Seven POD isoenzymes bands, R_r from slow to fast.

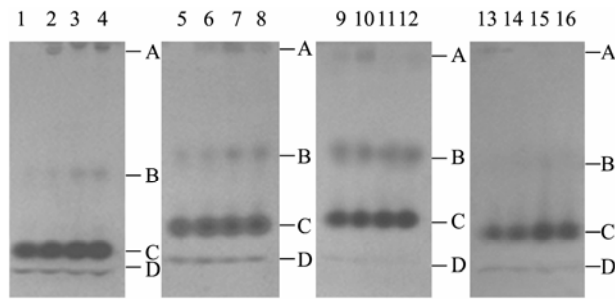


图3 球形红细菌 POD 同工酶酸性电泳法正交试验图谱
Fig. 3 The POD isoenzyme zymograms of *R. sphaeroides* by A-PAGE in orthogonal test

注: 1-16: 依照 $L_{16}(4^3)$ 正交表进行的第 1 组至第 16 组正交试验;
A-D: 迁移率(R_i)依次增大的 4 条 POD 同工酶。

Note: 1-16: The sixteen tests based on orthogonal test; A-D: Four POD isoenzymes bands, R_i from slow to fast.

表 2 $L_{16}(4^3)$ 正交试验设计及结果
Table 2 Design and results of $L_{16}(4^3)$ orthogonal test

序号 No.	A (%)	B (min)	C (%)	沼泽红假单胞菌 <i>R. palustris</i>	球形红细菌 <i>R. sphaeroides</i>
1	0.0	5	0.0	33.92	41.59
2	0.0	10	0.2	37.24	55.30
3	0.0	15	0.4	31.98	60.97
4	0.0	20	0.8	43.21	70.02
5	0.2	5	0.2	43.86	42.08
6	0.2	10	0.0	57.73	55.33
7	0.2	15	0.8	53.05	78.04
8	0.2	20	0.4	56.33	64.80
9	0.4	5	0.4	32.58	61.72
10	0.4	10	0.8	44.80	71.87
11	0.4	15	0.0	55.99	68.13
12	0.4	20	0.2	49.81	74.63
13	0.8	5	0.8	12.87	25.82
14	0.8	10	0.4	15.32	31.92
15	0.8	15	0.2	26.20	30.04
16	0.8	20	0.0	21.23	25.80

即进入模型的影响因素解释了红假单胞菌电泳得分变异的 91.96%，模型的拟合效果好，建立的模型为：

$$\hat{y}_1 = 38.7615 + 93.58209 x_1 - 57.91252 x_3 - 136.69026 x_1^2 + 33.18466 x_3^2 + 2.05665 x_2 x_3$$

2.2.2 球形红细菌电泳得分的模型拟合：对球形红细菌电泳得分建立二次型回归模型的 $F = 28.89$ 、 $P < 0.0001$ ，模型显著， $R^2 = 93.53\%$ ，球形红细菌电泳得分的变异有 93.53% 由进入模型的因素导致，模型的拟合效果好，建立的模型为：

$$\hat{y}_2 = 21.23305 + 82.38989 x_1 + 3.89565 x_2 +$$

$$17.46643 x_3 - 143.28693 x_1^2 - 0.11285$$

2.3 遗传算法搜索最优提取条件

2.3.1 遗传算法搜索红假单胞菌电泳最优条件：以红假单胞菌电泳得分的二次回归模型作为目标函数，采用遗传算法 10 次随机搜索结果见表 3，由历代适应度曲线(图 4)可知，得分的最大适应度在 8 代，最小适应度、平均适应度在 15 代，基本稳定在 61 分的水平上，搜索达到了较好的效果，10 次随机搜索结果的均值与变异度见表 4，得分平均水平达到 56.39，标准差为 2.208，95% 可信区间精度较高；3 个影响因素的变异度较小，95% 可信区间精度较高，搜索结果是比较理想的。红假单胞菌 POD 的最优电泳条件可以选择 2 号方案，即胶中 Triton X-100 含量为 0.31%，超声破碎 19 min，样品中 Triton X-100 含量为 0.79%，得分可达到 61.05。

表 3 红假单胞菌电泳最优条件搜索
Table 3 Random search results of optimization formulations of *R. palustris*

序号 No.	A (%)	B (min)	C (%)	总分 (Y) Total score
1	0.239370	18.27064	0.793701	58.08956
2	0.314961	19.25989	0.793701	61.04917
3	0.296063	5.036639	0.000000	54.48042
4	0.302362	19.37714	0.692913	57.97305
5	0.245669	19.98534	0.566929	54.63306
6	0.296063	19.86810	0.636220	57.06473
7	0.333858	13.04592	0.018898	54.18678
8	0.403150	6.53151	0.000000	54.26481
9	0.396850	18.88618	0.648819	55.96073
10	0.365354	19.72154	0.598425	56.19873

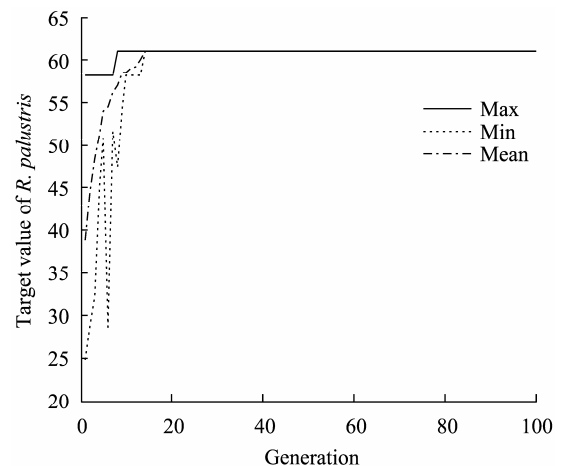


图 4 红假单胞菌电泳得分的历代适应度曲线
Fig. 4 Effects of target value and generations of *R. palustris*

2.3.2 遗传算法搜索球形红细菌电泳最优条件: 以球形红细菌电泳得分的二次回归模型作为目标函数, 10次随机搜索结果见表5, 历代适应度曲线如图5所示, 得分的最大适应度在8代, 最小适应度、平均适应度在15代, 基本稳定在81分的水平上, 搜索达到了较好的效果, 10次随机搜索结果的均值与变异度见表6, 得分平均水平达到79.45, 标准差为0.978, 95%可信区间精度较高; 3个影响因素的变异度较小, 95%可信区间精度较高, 搜索结果是比较理想的。球形红细菌 POD 的最优电泳条件可以选择2号方案, 即胶中 Triton X-100 含量为0.27%, 超声破碎16 min, 样品中 Triton X-100 含量为0.76%, 得分可达到81.00。

2.4 验证实验

按照2.3得到的优化条件进行电泳, 重复3次。采用 Total lab 120 软件对 POD 同工酶谱图做 POD 同工酶谱扫描图, 见图6和图7, 实验得分见表7。

沼泽红假单胞菌3次电泳平均得分69.80, 较61.05的预测值偏差很大, 原因是最佳条件下电泳后首次得到了一条新的酶带(见图6标记H), 该酶带3次平均得分13.16, 使得总分明显地提高。球形红细

表4 搜索结果的均值与变异度
Table 4 The mean levels and variability of random search results

Factor	$x \pm s$	95% CI for mean		Min	Max
		Lower	Upper		
X1	0.32 ± 0.056	0.28	0.36	0.24	0.40
X2	16.00 ± 5.762	11.88	20.12	5.04	19.99
X3	0.47 ± 0.332	0.24	0.71	0.0	0.79
Y	56.39 ± 2.208	54.81	57.97	54.19	61.05

表5 球形红细菌电泳最优条件搜索
Table 5 Random search results of optimization formulations of *R. sphaeroides*

序号 Number	A (%)	B (min)	C (%)	总分 Total score
1	0.277170	19.08403	0.743310	80.25201
2	0.270870	15.88911	0.762210	80.99862
3	0.321260	15.20029	0.629921	78.16129
4	0.170079	19.62628	0.781102	78.63367
5	0.359055	15.55936	0.674016	78.55324
6	0.314961	16.92233	0.674016	79.42115
7	0.327559	19.16463	0.737008	79.88031
8	0.296063	16.59990	0.623622	78.55716
9	0.277165	13.80068	0.800000	80.65068
10	0.377953	18.17538	0.737008	79.34745

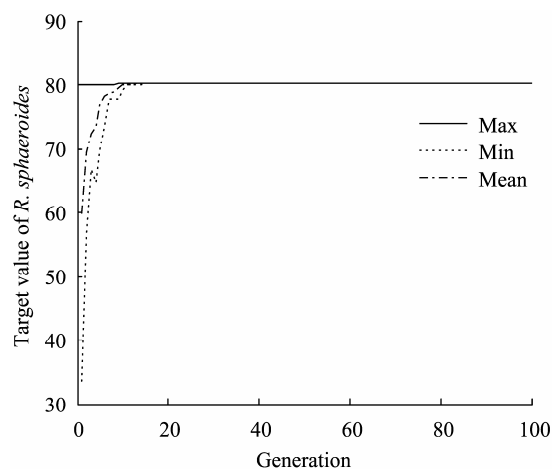


图5 球形红细菌电泳得分的历代适应度曲线
Fig. 5 Effects of target value and generations of *R. sphaeroides*

菌3次电泳平均得分81.08, 与81.00的预测值相近。验证实验结果表明, 最佳条件下得到的光合细菌 POD 酶谱较优化前清晰, 分离度得到提高, 而且沼泽红假单胞菌在优化后条件下分离得到了一条新酶带。实验结果与遗传算法预测结果几乎一致, 将遗传算法用于电泳条件优化的方法可行, 结果合理、可靠。

3 讨论

在实验中, 菌体收获时间和样品处理条件必须严格控制。POD 同工酶是生物逆境和衰老过程中的保护性酶之一, 会随着菌龄和生长环境发生变化^[12]; 超声波辅助冻融破碎法的菌体破碎效果优于单纯的超声波破碎法, 但超声时间过短 POD 释放不完全, 过长则损害 POD 活性; 样品离心程度非常重要, 如果离心不足, 残留的不溶性颗粒会引起谱带拖尾, 过度离心却又有损谱带的特征性^[13]。为保证样品均一, 本实验中的样品为同一批次制备。Triton X-100

表6 搜索结果的均值与变异度
Table 6 The mean levels and variability of random search results

Factor	$x \pm s$	95% CI for mean		Min	Max
		Lower	Upper		
X1	0.30 ± 0.058	0.26	0.34	0.17	0.38
X2	17.00 ± 1.951	15.61	18.40	13.80	19.63
X3	0.72 ± 0.062	0.67	0.76	0.62	0.80
Y	79.45 ± 0.978	78.75	80.15	78.16	81.00

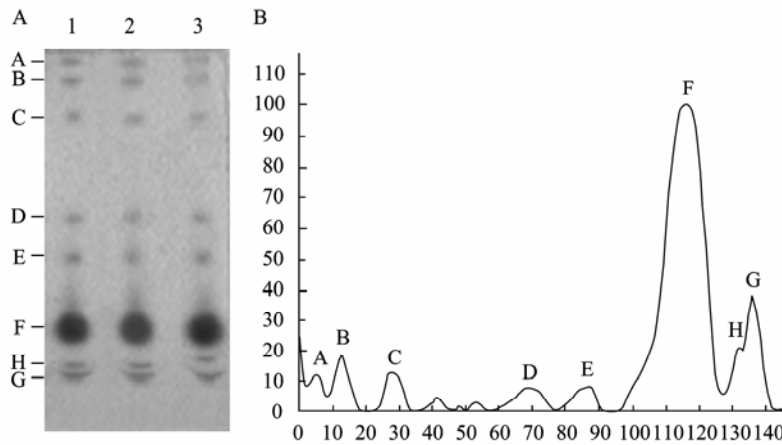


图 6 优化电泳条件下沼泽红假单胞菌 POD 同工酶图谱

Fig. 6 The POD isoenzyme zymograms of *R. palustris* by the optimized electrophoresis conditions

注: 凝胶中 Triton X-100 含量为 0.31%, 菌体破碎时间为 19 min, 样品中 Triton X-100 含量为 0.79%; A: POD 同工酶酶谱; B: 泳道 2 的 POD 同工酶酶谱扫描图; A-G: 迁移率(R_f)依次增大的 8 条 POD 同工酶。

Note: The gel's Triton X-100 concentration: 0.31%; Ultrasonic time: 19 min; The sample's Triton X-100 concentration: 0.79%; A: The POD isoenzyme zymograms; B: Lane 2's densitometric analysis of POD with Total lab120 Image software; A-G: Eight POD isoenzymes bands, R_f from slow to fast.

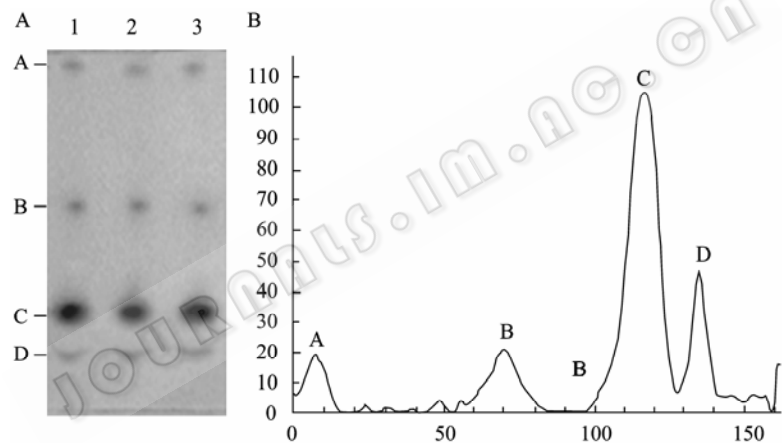


图 7 优化电泳条件下球形红菌 POD 同工酶图谱

Fig. 7 The POD isoenzyme zymograms of *R. sphaeroides* by the optimized electrophoresis conditions

注: 凝胶中 Triton X-100 含量为 0.27%, 菌体破碎时间为 16 min, 样品中 Triton X-100 含量为 0.76%; A: POD 同工酶酶谱; B: 泳道 2 的 POD 同工酶酶谱扫描图; A-D: 迁移率(R_f)依次增大的 4 条 POD 同工酶。

Note: The gel's Triton X-100 concentration: 0.27%; Ultrasonic time: 16 min; The sample's Triton X-100 concentration: 0.76%; A: The POD isoenzyme zymograms; B: Lane 2's densitometric analysis of POD with Total lab120 Image software; A-D: Four POD isoenzymes bands, R_f from slow to fast.

表 7 遗传算法的优化结果						
Table 7 Optimization results using genetic algorithm						
	沼泽红假单胞菌 <i>R. palustris</i>			球形红细菌 <i>R. sphaeroides</i>		
预测值 Calculate	61.05			81.00		
实验值 Result	67.04	73.92	68.43	78.06	80.76	84.43
平均值 Mean	69.80			81.08		

是一种非离子型表面活性剂, 添加适量的 Triton X-100 有助于酶的溶解和电泳过程中的分离。

聚丙烯酰胺凝胶电泳法具有分辨率高、简便、快速、重复性好等优点, 广泛用于蛋白质的分离、纯化、分析和制备。碱性非变性聚丙烯酰胺电泳法是 POD 分析的常用手段, 但有些过氧化物酶在较高 pH 条件下仅能得到微弱条带^[14]。A-PAGE 适于分离碱性、中性和酸性蛋白质^[15-16], 常用于分析碱性电

泳法无法有效分离的样品; Acid-Urea-Triton 电泳法在 A-PAGE 的基础上加入 Triton X-100 和尿素, Triton X-100 与蛋白质结合, 不同程度地增大分子质量, 使相似蛋白质的泳动速度改变而被分离, 大大提高了 A-PAGE 的分辨率^[17], 但尿素会使蛋白质变性, 无法用于活性酶的分析。本研究对前述两种方法予以改进, A-PAGE 的基础上添加 Triton X-100, 未添加尿素, 保证酶活的同时提高了电泳分辨率, 为光合细菌 POD 的研究提供了一种有效的分析方法。

遗传算法是基于自然选择和群体遗传机理的随机优化算法, 适用于复杂形态函数的全局寻优, 具有搜索效率高、避免局部优化和适宜多变量、非线性优化等特点^[18], 是一种高效的多因素多水平试验最优化搜索方法, 现已广泛应用于图像处理、工业优化控制、自适应控制、生物科学和中草药提取工艺优化等方面, 尚未见遗传算法与电泳法结合的报道。试验表明: 经遗传算法优化的改进的酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳法适用于光合细菌 POD 的分析, 在优化条件下得到的酸性电泳图谱明显比优化前清晰、条带分离充分, 并有新的谱带出现, 有很强的实际应用价值。遗传算法为电泳条件的优化提供了新的方法, 有待于进一步研究和应用。

致谢: 本研究得到山西医科大学生物化学与分子生物学教研室解军教授及张悦红、王惠珍、张栋老师的帮助, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Srinivasan A, Wu X, Lee MY, *et al.* Microfluidic peroxidase biochip for polyphenol synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, **81**(5): 563–569.
- [2] Karim Z, Husain Q. Redox-mediated oxidation and removal of aromatic amines from polluted water by partially purified bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009(63): 587–593.
- [3] De Souza SMAGU, Forgiarini E, De Souza AAU, *et al.* Toxicity of textile dyes and their degradation by the en-

zyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, 2007(147): 1073–1078.

- [4] Hamid M, Rehman KU. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 2009(115): 1177–1186.
- [5] 江均平, 王巧环. 大豆种皮过氧化物酶在酚类废水处理中的应用. *化工环保*, 2006, **26**(5): 382–385.
- [6] Renirie R, Hemrika W, Wever R. Peroxidase and phosphatase activity of active-site mutants of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000(275): 11650–11657.
- [7] Mohorcic M, Bencina M, Friedrich J, *et al.* Expression of soluble versatile peroxidase of *Bjerkandera adusta* in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 2009(100): 851–858.
- [8] Toda, Yoshimoto, Kudo. Purple photosynthetic bacteria and health foods: EP, 1172434, AI, 020116[P]. 2002-01-16.
- [9] 高丽, 张肇铭, 杨官娥. 光合细菌制剂对荷瘤小鼠免疫功能的影响及抑瘤作用. *山西医科大学学报*, 2004, **35**(1): 8–9.
- [10] 陆士伟, 赖天斌. 同工酶在农业上的应用. 广州: 广东科技出版社, 1987: 100.
- [11] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 174.
- [12] 李娟, 宋廷杰, 肖忠, 等. 水分胁迫下白术过氧化物酶同工酶的变化分析. *中国现代中药*, 2007, **9**(4): 11–13.
- [13] 闫冲, 聂凤提, 白楠. 安国地产黄芪及混淆品种子的蛋白质电泳鉴别. *时珍国医国药*, 2005, **16**(4): 289–290.
- [14] Manchenko GP 著. 华子春, 郑伟娟, 译. 酶的凝胶电泳检测手册. 第2版. 北京: 化学工业出版社, 2008: 157.
- [15] 何忠效. 生物化学实验技术. 北京: 化学工业出版社, 2004: 184.
- [16] 郭尧君, 余添. 阳极电泳和阴极电泳的快速半干新技术. *生物化学与生物物理进展*, 1996, **23**(4): 359–364.
- [17] Walker JM. *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002: 113.
- [18] 仇丽霞, 刘桂芬, 何大卫, 等. 二次响应面回归模型用遗传算法探索最优试验条件. *中国卫生统计*, 2004, **21**(4): 194–197.