

# 结合态过氧化物酶提取及分离纯化研究进展

柯思敏, 郭志雄, 潘腾飞, 潘东明

(福建农林大学 园艺学院, 福建 福州 350002)

**摘要:**结合态过氧化物酶在高等植物体内有着广泛的生理功能,去垢剂在其提取及分离纯化中扮演着重要角色。该研究从结合态过氧化物酶生理功能、去垢剂提取结合态过氧化物酶的机理与应用、结合态过氧化物酶柱层析分离、去垢剂对膜蛋白分析的影响及去除等方面进行了概述,旨在为进一步研究提供参考依据。

**关键词:**去垢剂;结合态过氧化物酶;膜蛋白;柱层析

**中图分类号:**Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0184-04

过氧化物酶可分为3类,第1类存在于线粒体、叶绿体及细菌中,如抗坏血酸过氧化物酶;第2类存在于真菌中,如锰过氧化物酶;第3类为典型的植物过氧化物酶<sup>[1]</sup>。该研究中的过氧化物酶(POD; EC 1.11.1.7)为存在于高等植物内的第3类过氧化物酶。目前的研究主要集中于可溶性 POD,关于结合态 POD 的文献报道较少,但其同样在生物进程中扮演着非常重要的角色。为了解结合态 POD 在植物体内如何发挥作用以及各类下游应用,纯化并且完全掌握它们的特性至关重要。

然而,在所有已经纯化并经过生化鉴定的蛋白中,膜蛋白只占非常少的一部分,结合态 POD 更是少之又少,很大程度上是由于膜蛋白比可溶性蛋白难纯化。大多数膜蛋白含量很低,它们整合在膜脂双分子层中,需要加入去垢剂才能够溶解在水溶液中。去垢剂是既亲水又亲油的两性分子,能够破坏磷脂双分子层,从而将整合膜蛋白从细胞膜中增溶出。因此,在结合态 POD 提取及分离纯化中,选择合适的去垢剂很重要,它们必须能够溶解结合态 POD,但又不影响其生物活性,并与蛋白质检测、鉴定,层析方法等相兼容。现拟从结合态 POD 生理功能、去垢剂提取结合态 POD 的机理与应用、结合态 POD 柱层析分离、去垢剂对膜蛋白分析的影响及去除等一系列问题展开讨论。

## 1 结合态 POD 生理功能

植物体内的 POD 主要以可溶态、离子结合态、共价结合态3种形式存在。可溶性 POD 存在于细胞内和细胞外,结合态 POD 存在于细胞膜、细胞壁以及某些细胞器,如线粒体、叶绿体。结合态 POD 主要参与植物体内激素调控<sup>[2]</sup>、生长发育调控<sup>[2]</sup>、木质素和木质素的生物合

成<sup>[3]</sup>、酚类物质酶促褐变,细胞壁防御机制<sup>[4]</sup>等。Thomas 等<sup>[5]</sup>研究表明,番茄生长发育初始阶段,可溶性、离子结合、共价结合 POD 活性均急剧上升,成熟时达到最大值。采后贮藏期间,不同植物离子结合 POD 活性变化呈现出不同趋势。Ingham 等<sup>[6]</sup>发现苹果在非气调贮藏期间,离子结合 POD 活性下降。吴振先等<sup>[7]</sup>对‘淮枝’荔枝 4℃贮藏期间,结合态 POD 活性先上升后下降,并伴随着新酶带的出现与消失。同时,离子结合 POD 还参与植物盐胁迫。Lin 等<sup>[8]</sup>发现遭受盐胁迫时,水稻根中离子结合态 POD 活性显著提高。此外,不同植物中可溶态与结合态 POD 热稳定性也有所差异。McLellan 等<sup>[9]</sup>研究表明桔子中离子结合 POD 比可溶性 POD 热稳定性更好,而 Moudling 等<sup>[10]</sup>发现苹果中可溶性 POD 热稳定更佳。虽然在莴苣<sup>[11]</sup>、土豆<sup>[12]</sup>、草莓<sup>[13]</sup>、小麦<sup>[14]</sup>、萝卜<sup>[15]</sup>、富士樱<sup>[16]</sup>、木瓜<sup>[17]</sup>等多种植物中均已成功分离纯化出离子结合 POD,但其生理功能还有待进一步研究。

## 2 去垢剂提取结合态 POD 的机理与应用

### 2.1 去垢剂的特性

去垢剂分子由2部分组成:一部分是带电荷的或极性的头基,另一部分是伸展的疏水性的烃。基于亲水头基的4种基本类型,去垢剂可分为非离子型(脂肪酸多元醇酯型、聚氧乙烯型)、阴离子型(硫酸盐型、磺酸盐型、磷酸盐型、羧酸盐型)、阳离子型(季铵盐型、铵盐型)、兼性离子型去垢剂<sup>[18]</sup>。去垢剂在溶液中会形成确定大小的球形聚集物,被称为胶束,去垢剂的疏水尾构成球体的核,亲水头位于与溶液接触的界面。胶束的形成是膜蛋白增溶的基础。膜蛋白亲水部分伸出周围的胶束,而疏水部分则被去垢剂覆盖。在给定温度下,能形成胶束去垢剂的最小浓度称为临界胶束浓度(CMC),在 CMC 以下,去垢剂以单体形式存在,在 CMC 以上,去垢剂胶束与去垢剂单体处于平衡<sup>[19]</sup>。

### 2.2 去垢剂的增溶机理

提取结合态 POD 的第一步是对细胞膜的增溶。因

第一作者简介:柯思敏(1990-),女,硕士研究生,研究方向为果树贮藏保鲜。E-mail:282651953@qq.com

收稿日期:2014-09-22

此,溶液中需要足够的去垢剂将全部的蛋白质容纳于胶束中。选择的去垢剂必须能够增溶目标蛋白质,但又不使其失活或丧失功能。去垢剂溶解膜蛋白可以分为以下几个阶段。首先,去垢剂会与膜上的胆固醇和磷脂竞争膜蛋白的疏水结合位点而结合到膜上<sup>[20]</sup>。随着去垢剂含量增加,去垢剂开始裂解细胞膜。去垢剂含量的进一步增加导致生成蛋白质-去垢剂-脂质复合物,这时,膜蛋白被“溶解”。继续增加去垢剂的含量,上述复合物则“脱脂”为去垢剂-脂质复合物和去垢剂-蛋白质复合物<sup>[21]</sup>。一般而言,去垢剂和蛋白质的比例为1:2时就能够将膜蛋白溶解为蛋白质-去垢剂-脂质复合物,比例为10左右或更高时会导致复合物的脱脂。

### 2.3 去垢剂在结合态 POD 提取中的应用

提取结合态 POD 的常规方法:先用 Tris-HCl、磷酸盐、醋酸盐等缓冲液(如有需要可加入 PVPP、抗坏血酸、PMSF、DTT 等稳定蛋白质)提取植物组织中的可溶性 POD,再在可溶性 POD 提取液中加入一定浓度的 Triton X-100、NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub> 等,通过室温孵育、超声处理等方式抽提出离子结合 POD,最后再用果胶酶、纤维素酶或商品化的混合酶如 Driselase,抽提出共价结合 POD。Sergio 等<sup>[22]</sup>用 50 mM 醋酸钠 pH 5.6,2% PVP 对洋葱可食用部分与叶片分别进行匀浆,离心,上清液即为可溶性 POD (SP),50 mM 醋酸钠 pH 5.6 悬浮沉淀,离心,重复 3 次,再用蒸馏水悬浮沉淀,离心,重复 2 次,沉淀悬浮于 3 M NaCl 中,离心,上清液为离子结合 POD (IBP),0.2 M 醋酸钠 pH 5.6 (内含果胶酶,纤维素酶)悬浮沉淀,35℃孵育过夜,离心,上清液即为共价结合 POD (CBP)。McDougall 等<sup>[23]</sup>用 50 mM Tris-HCl pH 8.0(内含 1 M NaCl,0.5%(V/V) Triton X-100)对亚麻茎去皮组织进行匀浆,离心,悬浮沉淀,重复 8~10 轮,再加入 10 mg/mL Driselase,室温孵育 18 h 获得共价结合 POD 粗酶液。Asthir 等<sup>[24]</sup>先用 2 M NaCl 从小麦叶片中提取离子结合 POD,再用蒸馏水洗涤沉淀后,加入 0.5%(W/V) EDTA 提取与细胞壁果胶结合的 POD。

离子结合 POD 的提取液主要为单独使用高浓度的盐,去垢剂或将二者共同使用。单独使用 NaCl 提取离子结合 POD 在多种植物中均有报道。Al-Senaidy 等<sup>[25]</sup>将枣椰树叶片研磨成粉,悬浮于冷丙酮中,过滤,滤渣室温干燥 30 min,用 100 mM 磷酸钠 pH 6.0 (内含 1% PVP)对其进行匀浆,纱布过滤,离心,沉淀悬浮于 100 mM 磷酸钠 pH 6.0、100 mM NaCl、0.1 mM PMSF 中,超声处理 5 min,离心,上清液即为离子结合 POD 粗酶液。Neves<sup>[26]</sup>用 0.1 M 磷酸钾 pH 6.5(内含 1% PVP,1 mM L-半胱氨酸)对桃肉进行匀浆,纱布过滤,离心,沉淀悬浮于上述提取液中,再加入 1.0 M NaCl,机械搅拌 12 h,离心,上清液即为离子结合 POD 粗酶液。Márquez 等<sup>[27]</sup>用 6%(W/V) NaCl 从香草豆荚中提取出离子结合 POD。Wakabayashi 等<sup>[28]</sup>用 1.5 M NaCl 从红豆胚芽中

提取出离子结合 POD。Verma 等<sup>[29]</sup>、Clemente<sup>[30]</sup>、Valderrama 等<sup>[31]</sup>分别用 1 M NaCl 从芥菜幼根、柑橘,“富士”苹果中提取出离子结合 POD。可见,提取不同物种离子结合 POD 所需盐浓度不尽相同,这可能是由于 POD 与细胞膜之间的静电相互作用,疏水相互作用强弱不同。

于相分配效应,当温度高于去垢剂浊点时,胶束聚集起来,形成悬浊液,离心后就形成去垢剂相和水相,从而达到提取结合态 POD 的目的。

外周蛋白通过静电作用或某些情况下通过疏水作用与细胞膜相联系,因此,使用高盐溶液即可将外周膜蛋白从膜上解离。而整合膜蛋白至少有 1 段蛋白质序列嵌入细胞膜中,将其从膜上解离出需要使用去垢剂。Šukalović 等<sup>[33]</sup>使用 1%(W/V) Triton X-100,1 M NaCl 从玉米根中提取出离子结合 POD。王蓓等比较了单独使用 NaCl、Triton X-100 以及将二者共同使用对“乌叶”荔枝结合态 POD 的提取效果,其认为 NaCl 在提取时起主导作用,Triton X-100 有一定增溶作用,二者共同使用对提取有显著的协同效果(待刊)。

### 3 结合态 POD 的柱层析分离

将结合态 POD 从细胞膜中溶解出来后,就可以分离纯化目标 POD。与 RNA、DNA 不同,用一套单一的方法纯化膜蛋白是不可能的。每一个膜蛋白的理化性质、最适宜的去垢剂和纯化条件都是独特的。因此,需要反复试验以确定最佳条件。膜蛋白纯化主要运用柱层析技术,如疏水作用层析、离子交换层析、亲和层析、凝胶过滤等。

目前,较为普遍的是 2 步、3 步柱层析纯化离子结合 POD,如离子交换层析→凝胶过滤或疏水作用层析→离子交换层析→凝胶过滤。若结合态 POD 组分较多,则可能需要更为复杂的柱层析策略。Onsa 等<sup>[32]</sup>用从西谷椰子中提取出的离子结合 POD 粗酶液,先过 DEAE-Toyopearl 650 M,将未吸附在柱上而流穿的酶液收集起来,透析后过 CM-Toyopearl 650 M,分别在 0.09~0.10 M NaCl 和 0.11~0.13 M NaCl 处洗脱出 2 个离子结合 POD 活性峰,最后过 Sephadex-G100 柱层析,2 个组分的纯化倍数分别为 76.5 和 37.0,SDS-PAGE 显示均为单一条带,分子量分别为 51.2、43.8 kDa。不同植物来源的离子结合 POD 与阳离子交换剂的结合力不同,因而在不同浓度 NaCl 处洗脱下来。莴苣离子结合 POD 过 CM-Cellulose,其洗脱的 2 个活性峰分别在 0.25 M NaCl 和 0.35 M NaCl 处<sup>[11]</sup>。而将草莓离子结合 POD 从 CM-Cellulose 上洗脱下来则需 1.0 M NaCl<sup>[34]</sup>。

也有少数文献报道将去垢剂直接应用于结合态 POD 柱层析分离。Mika 等<sup>[35]</sup>过 Mono S 柱、Superdex 200 柱从玉米根中分离纯化出离子结合 POD,并在 Mono S 柱、Superdex 200 柱的平衡缓冲液中均加入 1 mM CHAPS。

综合而言,目前纯化膜蛋白最成功和最有用的方法是亲和层析。由于凝胶过滤要求相对小体积的浓缩样品,离子交换层析对缓冲液的离子强度敏感,因此纯化、浓缩以及在不同层析步骤中进行盐置换均可使用亲和层析。常用的膜蛋白亲和层析有凝集素亲和层析、配体亲和层析、抗体亲和层析。

凝集素是糖结合蛋白,膜蛋白通常是糖基化的,凝集素-糖的相互作用可逆并且被单糖控制,因此使用凝集素层析纯化膜蛋白很有效。Mc Dougall 等<sup>[23]</sup>过 DEAE-Sepharose 洗脱出 4 个亚麻茎去皮组织离子结合 POD 活性峰,置换缓冲液后,将第 4 个活性峰组分过 Concanavalin-A Sepharose,在 11 mM  $\alpha$ -甲基吡喃甘露糖苷处洗脱出活性峰。使用凝集素层析需要注意以下 2 个方面:首先,特定的凝集素亲和层析纯化的是一组具有特定糖基化类型的糖蛋白,纯化程度达不到配体或抗体亲和层析。其次,凝集素对特定类型的去垢剂敏感。尽管可以忽略非离子型去垢剂,如 Triton X-100 对麦胚凝集素或 ConA 配体结合活性的影响,但离子型去垢剂,如 SDS 可能会使凝集素失活<sup>[36]</sup>。

在去垢剂存在下,膜蛋白的柱层析需要注意以下 4 点:一是需要使用足够的去垢剂,以维持膜蛋白在缓冲液中的溶解状态并防止蛋白质聚集;二是离子型去垢剂,如脱氧胆酸盐或胆酸盐,会干扰膜蛋白与离子交换剂上配基的结合行为,不适用于离子交换层析;三是含糖基的去垢剂也许会干扰特定的亲和层析,如辛基葡糖苷会干扰 ConA 层析;四是由于溶解的膜蛋白存在于去垢剂胶束中,在凝胶过滤中膜蛋白的表现分子量更大。

#### 4 去垢剂对膜蛋白分析的影响及去除

在溶解膜蛋白的过程中使用了高含量的去垢剂,它们会影响下游的应用,如蛋白质含量测定、质谱和核磁共振检测等。具有芳香环结构的去垢剂,如 Triton X-100、Triton X-114、NP-40 等在 280 nm 处有强烈吸收峰,不适用于紫外吸收法测定蛋白质含量。去垢剂还会影响许多其它的光谱技术。红外光谱中,在测定蛋白质生化性质相关的波长处,去垢剂的疏水与亲水基团都有吸收峰,线性和圆二色光谱中,去垢剂的手性头基会产生显著信号<sup>[37]</sup>。去垢剂还会与染料发生反应,因此基于染料的蛋白质测定方法也不适宜。另外,由于去垢剂也能够被电离,在不同检测系统中导致强信号,影响质谱检测。目前已有应用于 ESI-MS 的氟化去垢剂<sup>[38]</sup>与用于 MALDI-MS 的可裂解去垢剂<sup>[39]</sup>。

透析可有效去除部分去垢剂。胶束小至可以穿过透析袋,临界胶束浓度高至去垢剂以单体形式存在的去垢剂均可以用透析去除。而临界胶束浓度低去垢剂,如 Tween、C12E9、Brij、Triton X-100 等则很难通过去垢剂去除。添加能与去垢剂单体形成络合物的环糊精<sup>[40]</sup>,或使用能与去垢剂结合的 Biobead 或类似疏水树脂<sup>[41]</sup>均能有效去除去垢剂。此外,可以使用离子交换或亲和

层析将蛋白质结合到柱子上,再将去垢剂洗去,然后用合适的缓冲液洗脱蛋白质<sup>[42]</sup>。

#### 5 结论

过氧化物酶参与了植物体内的多种代谢途径,而目前的研究主要集中于可溶性过氧化物酶。结合态过氧化物酶由于难纯化、组分多样化、高度糖基化,结构复杂化等,导致对其功能研究尚不深入且不全面。分离纯化结合态过氧化物酶不仅能充分利用资源,如不食用的外果皮、根茎等部位,还能将其用于酶联免疫试剂盒,去除工业垃圾中的酚类物质而保护环境。因此,分离纯化结合态过氧化物酶不仅具有试验价值,更具有重要的现实意义。

没有一种现成的方法可以用于大部分结合态过氧化物酶提取及分离纯化,每一个物种甚至是同一物种不同组织部位的结合态过氧化物酶的分离纯化都不尽相同,所以,分离纯化每一种结合态过氧化物酶都需要经过反复试验确定最佳体系。应用去垢剂提取结合态过氧化物酶的根本原则就是选择既能充分溶解天然膜但又不破坏其生物功能的去垢剂;在柱层析体系中使用去垢剂则需注意:尽量减小去垢剂对层析柱分辨率的影响,且不影响下游的蛋白质定量,质谱分析等操作。

#### 参考文献

- [1] van Doorn W G, Ketsa S. Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2014, 95(0): 64-69.
- [2] Cosio C, Dunand C. Specific functions of individual class III peroxidase genes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(2): 391-408.
- [3] Lüthje S, Meisrimler C N, Hopff D, et al. Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants[J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(10): 1124-1135.
- [4] Song Y, Ruf J, Lothaire P, et al. Association of duoxes with thyroid peroxidase and its regulation in thyrocytes[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2010, 95(1): 375-382.
- [5] Thomas R L, Jen J J, Morr C V. Changes in soluble and bound peroxidase-IAA oxidase during tomato fruit development[J]. *Journal of Food Science*, 1982, 47(1): 158-161.
- [6] Ingham L M, Parker M L, Waldron K W. Peroxidase: changes in soluble and bound forms during maturation and ripening of apples[J]. *Physiologia Plantarum*, 1998, 102(1): 93-100.
- [7] 吴振先, 苏美霞. 贮藏荔枝果皮多酚氧化酶及过氧化物酶与褐变的研究[J]. *华南农业大学学报*, 1998, 19(1): 12-15.
- [8] Lin C C, Kao C H. NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings[J]. *Plant and Soil*, 1999, 216(1-2): 147-153.
- [9] McLellan K M, Robinson D S. Heat stability of peroxidases from orange[J]. *Food Chemistry*, 1984, 13(2): 139-147.
- [10] Moudling P H, Grant H, McLellan K, et al. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 1987, 22(4): 391-397.
- [11] Boeuf G, Bauw G, Legrand B, et al. Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2000, 38(3): 217-224.
- [12] Boucoiran C F, Kijne J W, Recourt K. Isolation and partial characterization of thermostable isoperoxidases from potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber



- sprouts[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(3): 701-707.
- [13] Cívello P M, Martínez G A, Chaves A R, et al. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(10): 2596-2601.
- [14] Converso D A, Fernández M E. Peroxidase isozymes from wheat germ: purification and properties[J]. Phytochemistry, 1995, 40(5): 1341-1345.
- [15] Young Lee M, Soo Kim S. Characteristics of six isoperoxidases from Korean radish root[J]. Phytochemistry, 1994, 35(2): 287-290.
- [16] Zhou S, Sauve R, Howard E. Identification of a cell wall peroxidase in red calli of *Prunus incisa* Thunb[J]. Plant Cell Reports, 2002, 21(4): 380-384.
- [17] da Silva E, Lourenco E J, Neves V A. Soluble and bound peroxidases from papaya fruit[J]. Phytochemistry, 1990, 29(4): 1051-1056.
- [18] 欧阳向南. 新型表面活性剂的合成与性能研究[D]. 荆州: 长江大学, 2013.
- [19] Arachea B T, Sun Z, Potente N, et al. Detergent selection for enhanced extraction of membrane proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2012, 86(1): 12-20.
- [20] 张辰艳, 张仙芳, 郭云珠, 等. 去垢剂在膜蛋白纯化和结晶中应用的研究进展[J]. 材料导报, 2011(5): 73-78.
- [21] Cai Z, Hakkinen P J. Detergent[J]. In: Wexler P, ed. Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)[M]. Oxford: Academic Press, 2014: 10-13.
- [22] Sergio L, Cardinali A, de Paola A, et al. Biochemical properties of soluble and bound peroxidases from artichoke heads and leaves[J]. Food Technology and Biotechnology, 2009, 47(1): 32.
- [23] Mc Dougall G J, Morrison I M. Partial purification of peroxidase isozymes with altered substrate specificity from flax stem cell walls[J]. Journal of Plant Physiology, 1995, 146(4): 393-397.
- [24] Asthir B, Koundal A, Bains N. Kinetic and thermodynamic behaviour of wall-bound peroxidase from wheat leaves infected with stripe rust[J]. Plant Growth Regulation, 2009, 59(2): 117-124.
- [25] Al-Senaidy A M, Ismael M A. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.)[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2011, 18(3): 293-298.
- [26] Neves V A. Ionically bound peroxidase from peach fruit[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2002, 45(1): 7-16.
- [27] Márquez O, Waliszewski K N, Oliart R M, et al. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean[J]. LWT-food Science and Technology, 2008, 41(8): 1372-1379.
- [28] Wakabayashi K, Nakano S, Soga K, et al. Cell wall-bound peroxidase activity and lignin formation in azuki bean epicotyls grown under hypergravity conditions[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(9): 947-954.
- [29] Verma K, Shekhawat G S, Sharma A, et al. Cadmium induced oxidative stress and changes in soluble and ionically bound cell wall peroxidase activities in roots of seedling and 3-4 leaf stage plants of *Brassica juncea* (L.) Czern [J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(7): 1261-1269.
- [30] Clemente E. Peroxidase from oranges *Citrus sinensis* (L.) Osbeck[J]. European Food Research and Technology, 2002, 215(2): 164-168.
- [31] Valderrama P, Clemente E. Isolation and thermostability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars Gala and Fuji[J]. Food Chemistry, 2004, 87(4): 601-606.
- [32] Onsa G H, bin Saari N, Selamat J, et al. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*[J]. Food Chemistry, 2004, 85(3): 365-376.
- [33] Šukalović V H T, Vuletić M, Vučinić Ž. The role of p-coumaric acid in oxidative and peroxidative cycle of the ionically bound peroxidase of the maize root cell wall[J]. Plant Science, 2005, 168(4): 931-938.
- [34] López-Serrano M, Barceló A R. Purification and characterization of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries[J]. Food Chemistry, 1996, 55(2): 133-137.
- [35] Mika A, Buck F, Luthje S. Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots[J]. Journal of Proteomics, 2008, 71(4): 412-424.
- [36] Linke D. Chapter Eleven-Explanatory Chapter: Choosing the Right Detergent[J]. In: Jon L, ed. Methods in Enzymology[M]. Academic Press, 2014: 141-148.
- [37] McCaslin D R. Detergent Properties[J]. In: Lennarz W J, Lane M D, eds. Encyclopedia of Biological Chemistry[M]. Waltham: Academic Press, 2013: 644-648.
- [38] Ishihama Y, Katayama H, Asakawa N. Surfactants usable for electrospray ionization mass spectrometry[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 287(1): 45-54.
- [39] Norris J L, Porter N A, Caprioli R M. Mass spectrometry of intracellular and membrane proteins using cleavable detergents[J]. Analytical Chemistry, 2003, 75(23): 6642-6647.
- [40] Degrip W, Vanostrum J, Bovee-Geurts P. Selective detergent-extraction from mixed detergent/lipid/protein micelles, using cyclodextrin inclusion compounds: a novel generic approach for the preparation of proteoliposomes[J]. Biochemical Journal, 1998, 330: 667-674.
- [41] Rigaud J L, Levy D, Mosser G, et al. Detergent removal by non-polar polystyrene beads[J]. European Biophysics Journal, 1998, 27(4): 305-319.
- [42] Arnold T, Linke D. The use of detergents to purify membrane proteins [J]. Current Protocols in Protein Science, 2008, 53(0): 4-8.

## Research Progress on the Extraction, Isolation and Purification of Bound Peroxidases

KE Si-min, GUO Zhi-xiong, PAN Teng-fei, PAN Dong-ming

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

**Abstract:** Detergents played an important role in the extraction, isolation and purification of bound peroxidases which had a wide range of physiological functions in higher plants. This research summarized the physiological functions and column chromatography of bound peroxidases, the mechanism and application of detergents to the extraction of bound peroxidases, the impacts of detergents on membrane proteins analysis and removal, and aimed at providing references to its further research.

**Keywords:** detergents; bound peroxidases; membrane proteins; column chromatography