

多管藻铜锌超氧化物歧化酶的纯化及性质研究*

STUDIES ON THE PURIFICATION AND PROPERTIES OF COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE FROM *Polysiphonia urceolata*

魏玉西 杭 瑚** 张立新

(青岛大学化学系 266071)

关键词 多管藻,超氧化物歧化酶,纯化,性质

作为超氧阴离子(O_2^-)清除剂的超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, 简称SOD)广泛存在于需氧生物体内。自从McCord和Fridovich 1969年发现SOD后,国内外不少学者对SOD的分离纯化、理化性质及其在生物学和临床等方面的作用进行了广泛的研究,其中以铜锌超氧化物歧化酶($Cu \cdot Zn$ -SOD)的研究最为深入。目前国内外已开发或正在开发的SOD资源有牛血、猪血、猪肝、人血、刺梨等。但关于藻类中SOD的提取尚未见报道。本文结合多管藻的综合利用,从多管藻(*Polysiphonia urceolata*)中提取出浓度较高的 $Cu \cdot Zn$ -SOD液,并对其某些性质作了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 原料

新鲜多管藻(*Polysiphonia urceolata*)采自青岛太平角海域,于海水中漂洗、脱水并于室温下晾干后,置于冰箱中备用。

1.1.2 试剂

DEAE纤维素DE32(Whatman),胰蛋白酶(进口分装),聚乙二醇20000(进口分装),邻苯三酚(A.R),二甲胍酸钠(A.R),尿素(A.R),透析袋。

1.1.3 仪器

高速组织捣碎机(DS-200型);高速离心机(TGL-16C型),721型分光光度计;722型光栅分光光度计;7530-G型UV/VIS分光光度计。

1.2 方 法

1.2.1 酶的粗提

取150g晾干的多管藻,加800ml蒸馏水浸泡0.5~1.0h,在高速组织捣碎机中匀浆0.5h,放入冰箱(4℃)静置3~4h,用纱布挤压得暗红色提取液,重复提取一次。将两次提取液合并所得1000ml暗红色粗提液再离心(3000r/min)15min,得澄清的红色粗提液,即酶的粗提液I。

1.2.2 酶的初步纯化

将1000ml粗提液I分作两份各500ml,采用不同方法得粗酶液(1)和(2)以作对比。

(1)第1份:加 $(NH_4)_2SO_4$,使 $(NH_4)_2SO_4$ 质量百分比浓度达35%,搅拌20min,放入冰箱(4℃)静置24h后,吸出上层清液,弃去下层红色沉淀。此时上清液显红色,加硅藻土脱至无色。再加 $(NH_4)_2SO_4$ 使 $(NH_4)_2SO_4$ 质量百分比浓度达55%,搅拌20min,离心(12000r/min)。将沉淀溶解于pH7.8的0.002mol/L Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 缓冲溶液,装入透析袋在冰箱中透析24h,换水5次,将透析液装入试管冷藏备用。

(2)第2份:放入冰箱,冷却至0℃左右,加入125ml乙醇-氯仿(V:V=2:3)混合液(-10℃),搅拌20min,离心(3000r/min)15min。将上层清液加入350ml丙酮(-10℃)搅拌,在冰箱中(0℃)静置30min,离心(3000r/min)15min得深红色沉淀。将此沉淀溶解于50ml蒸馏水中,装入透析袋,在溶有20g聚乙二醇20000的500ml蒸馏水中透析24h,以除去沉

* 山东省自然科学基金资助项目 Y96D07060 号。

** 通讯联系人

收稿日期:1998-11-02;修回日期:1999-04-21



淀中的丙酮,再放入蒸馏水中透析 10 h,换水 4 次,除去无机盐。将透析液装入试管,冷藏备用。

1.2.3 酶的二次纯化^[1]

向酶的初步纯化步骤中得到活性较高的透析液加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,使之浓度达到 35%,离心(3 000 r/min) 15 min,取中间层无色液体放入透析袋在 0℃左右透析 24 h,换水 7~8 次,再在溶有 20 g 聚乙二醇 20000 的 500 ml 蒸馏水中浓缩至 30 ml,上 DEAE 纤维素柱(1×14 cm,层析柱先用 0.002 mol/L pH7.8 磷酸钾缓冲液淋洗)。控制流速 30 ml/h,用 0.02~0.1 mol/L pH7.8 磷酸钾缓冲液进行线性梯度洗脱,每管 8 ml 作部分收集,在 260 nm 处测吸光值。

1.2.4 酶的性质研究

(1) 酶的测活方法 采用改进的超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法^[2]测 SOD 活力,反应液总体积为 9 ml,反应温度为 25℃,根据定义,1 ml 反应液在上述条件下使邻苯三酚自氧化速率降低 50%的酶量为一个活力单位(U),在 420 nm 处测自氧化速率 A (吸光度)为 0.06/min。由实验可知一个活力单位 U 相当于 100 ng 纯酶蛋白。本实验采用的是 Tris-HCl 缓冲液,抑制率公式如下:

$$\text{抑制率} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100\%$$

而 SOD 活力单位计算公式为:

$$\text{SOD 活力单位(U/ml)} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times \frac{18}{V} \times N$$

其中, A_0 为自氧化速率, A_s 为加抑制后的自氧化速率, V 为加样体积(ml), N 为样品稀释倍数。

(2) 超氧化物歧化酶类型鉴定 根据 Asada 1975 年所做的研究, $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$, Mn-SOD 和 Fe-SOD 在性质上存在着许多差异。 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 对 KCN 和 H₂Q 敏感,可被 1 mmol/L 的 KCN 抑制 90%以上, H₂Q 亦可极大地抑制它的活性;而 Mn-SOD 对 KCN 和 H₂O₂ 均不敏感,二者均不能抑制其活性; Fe-SOD 对 KCN 敏感,而对 H₂Q 不敏感。因此,可通过向样品液中加一定量 H₂Q 后测得的活力值来初步鉴定多管藻超氧化物歧化酶的类型。

取 0.2 ml 样品液,加入 2 滴 H₂O₂ 溶液(浓度为 30%),按上述测活方法测其活性。

(3) 超氧化物歧化酶的紫外吸收光谱 超氧化物歧化酶在紫外光区有特定的吸收峰,可通过吸收峰鉴

定超氧化物歧化酶的类型,并分析多管藻 SOD 与其他生物种类 SOD 的差异。

(4) 尿素对多管藻 SOD 的影响 尿素是一种蛋白质沉淀剂,不同的 SOD 对其有不同的抗性。

分别配制 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mol/L 8 种尿素溶液,分别加 2 ml 酶液,测 SOD 活性。

(5) 胰蛋白酶对多管藻 SOD 的影响 准确称 0.50 g 胰蛋白酶,溶于 10 ml 0.05 mmol/L pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中(内含 0.02 mmol/L CaCl₂),加 5 ml 酶液,恒温(37℃),分别在 5, 10, 15, 25, 35 min 后测其活性。

2 结果与讨论

2.1 酶的纯化

2.1.1 初步纯化

将 1.2.2 中两种方法得到的粗酶液,分别在邻苯三酚体系中测其活性,结果见表 1。

由表 1 可见,方法(1)得到的粗酶液(1)活性较小,而方法(2)得到的粗酶液(2)活性较大,邻苯三酚自氧化抑制率达 50%,这是由于(1)法加 35% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 可形成大量蛋白质沉淀,但大量 SOD 亦可被杂蛋白沉淀所吸附,致使当加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 量达 55% 时产生的 SOD 沉淀相对较少;而(2)法中 SOD 能被丙酮沉淀,沉淀量较小,这样既便于以后纯化,又使 SOD 不易被吸附。故酶的初步纯化应选方法(2)。

2.1.2 酶的二次纯化

将部分收集所得的洗脱液在 260 nm 处测吸光值,据此作出洗脱曲线(见图 1)。将 ②~⑩管合并为 A,(59)~(67)管合并为 B,用紫外分光光度计分别对 A 和 B 进行扫描,结果表明 B 在 266 nm 处有最高吸收峰,而 A 在紫外区无特征吸收峰,又经活性测定发现 B 活性较大,故 B 为活性 SOD 液。将 B 在溶有聚乙二醇 20 000 的蒸馏水中浓缩至 5 ml,放入冰箱备用。

2.1.3 纯化结果

500 ml 粗提液总活力值为 27 000 U 以纯化后得总活力为 8 000,回收率为 30%,比活力为 6 153 U/mg 蛋白,低于文献袁勤生等 1987 年的报道值。纯化结果见表 2。

在整个纯化过程中,回收率和比活力均未达到理想值,造成这种现象的原因主要可能有以下几方面:

(1) 在丙酮沉淀过程中温度未能控制太低;(2) 上柱时



间太长;(3)上柱时温度太高(20℃左右)。从而使部分酶蛋白变性失活。

2.2 酶的性质

2.2.1 酶的特征吸收光谱

将洗脱液 B 在 7530-G 分光光度计下扫描,发现 B 在 266 nm 处有最大吸收峰。根据不同的资料报道,不同来源的 Cu·ZnSOD 的紫外吸收都有偏离蛋白质特征吸收波长(280 nm) 而向短波长移动的特点,如邹国林等 1992 年报道小白菜叶绿体 Cu·ZnSOD 紫外吸收峰为 272 nm,袁勤生等 1987 年报道猪的红细胞 Cu·ZnSOD 紫外吸收峰为 263 nm,余瑞元等 1990 年报道鸭血红细胞 Cu·ZnSOD 在 258 nm 处有最大吸收峰,McCord 等 1977 年报道人血红细胞 Cu·ZnSOD 在 265 nm 处有最大吸收峰,李书宽等 1991 年报道茶叶 Cu·ZnSOD 在 274 nm 处有最大吸收峰。因此,多

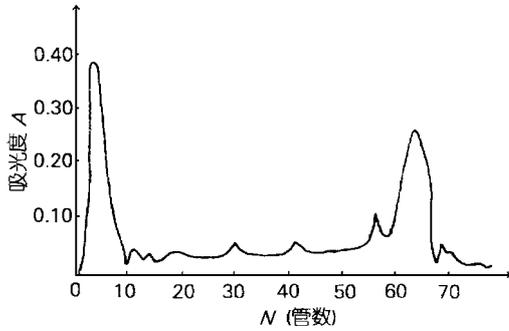


图 1 DE32 柱层析洗脱曲线

表 1 两种方法提取的粗酶液活性比较

供试酶液	时间(s)						As	抑制率 %
	60	90	120	150	180	210		
空白	0.082	0.112	0.142	0.170	0.201	0.232	0.060	
粗酶液(1)	0.061	0.088	0.115	0.141	0.168	0.195	0.054	10
粗酶液(2)	0.088	0.101	0.114	0.128	0.142	0.157	0.030	50

管藻 SOD 最大吸收峰与人血红细胞 SOD 最大吸收峰十分接近,表明二者在芳香族氨基酸组成上可能很相似。

2.2.2 超氧化物歧化酶类型鉴定

根据测活方法,得到氧化速率对比曲线(见图

2)。由图 2 可见 H₂O₂ 对多管藻 SOD 有较大的抑制作用,且根据多管藻 SOD 的紫外吸收光谱向短波长方向移动的特点,可以断定,多管藻 SOD 属于 Cu·ZnSOD。

表 2 多管藻 SOD 的纯化结果

步骤	总活力(U)	总蛋白(mg)	比活力(U/mg)	活力回收%
粗提液	27 000	839	32	100
初步纯化(2)酶液	20 250	2.7	7 500	75
DE-32 柱层析洗脱液(B)	8 000	1.3	6 153	30

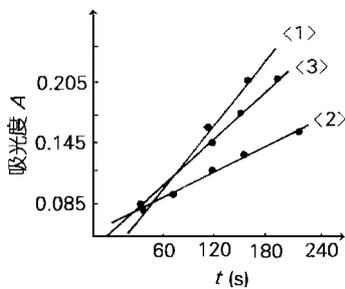


图 2 氧化速率对比曲线

(1)空白;(2)B液;(3)B液+2滴30% H₂O₂

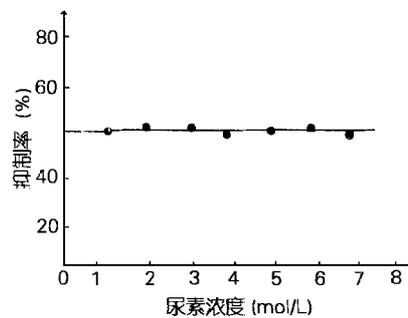


图 3 不同浓度尿素溶液对多管藻 Cu·ZnSOD 活性的影响

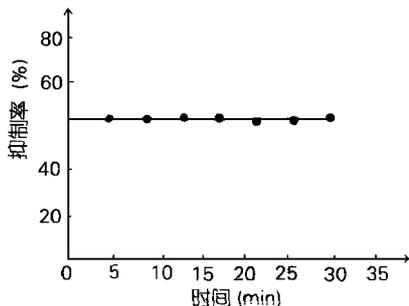


图4 胰蛋白酶对多管藻 Cu·ZnSOD活性的影响

2.2.3 尿素对多管藻 Cu·ZnSOD的影响

在不同浓度的尿素溶液中加入等量 B液,在 25℃测其活性,发现活性未发生变化(图3)。可见,多管藻 Cu·ZnSOD对蛋白质变性剂——尿素有较强的抗性。这一特性与李书宽等 1991 年报道的茶叶 Cu·

ZnSOD、人血红细胞及箭鱼肝 Cu·ZnSOD 极为相似。

2.2.4 胰蛋白酶对多管藻 Cu·ZnSOD的影响

B液加胰蛋白酶后测 Cu·ZnSOD活性,发现多管藻 Cu·ZnSOD经胰蛋白酶作用 35 min 其活性并未下降(见图4),这一特点与茶叶 Cu·ZnSOD类似。其原因可能是李书宽等 1991 年报道的胰酶未能水解 Cu·ZnSOD,或者是 Cu·ZnSOD已被部分水解,但活性中心却得到保留,未影响到其活性。真正原因尚待进一步研究。

参考文献

- 1 李建武等.生物化学实验原理和方法.北京:北京大学出版社,1994. 318
- 2 静天玉等.生物化学与生物物理进展,1995,22(1):84

(本文编辑:张培新)