仙人掌超氧化物歧化酶的制备研究

杨 洋，任 红，肖克宁，韦小英，李 红
(广西大学生命科学与技术学院，广西 南宁 530004)

摘 要：对500g仙人掌进行捣碎匀浆、硫酸铵分级沉淀浸提、离心、除杂蛋白、溶解等一系列处理后得到SOD(超氧化物歧化酶)粗酶液。所得粗酶液用聚酰胺(100目)层析柱层析实现纯化，再经过冷冻干燥即得到含有SOD的白色粉末。用联苯三酚法测定该白色粉末具有的酶活力。实验结果显示得到含有SOD的白色粉末酶活力为0.9590 × 10^4U/g粉末。影响酶活力大小的外界因素主要包括pH值、温度、抑制剂。结果显示在pH值为7.5～8.5 时酶活力最大，稳定性也好。温度维持在25～30℃时酶活力最高。由于过氧化氢和氰化钾能使仙人掌SOD的酶活力显著下降，因而可以判断从仙人掌中提取到的SOD是Cu·Zn-SOD。

关键词：仙人掌；超氧化物歧化酶；提取；纯化；测定

Research on the Preparation of Superoxide Dismutase from Cactus

YANG Yang，REN Hong，XIAO Ke-ning，WEI Xiao-ying，LI Hong
(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: After a series of treatment to cactus including crush and pulping, ammonium sulfate precipitation extract, centrifuge, getting rid of protein and fuse, the superoxide dismutase was obtained in the liquid. The liquid containing superoxide dismutase needed to be purified with chromatography. The medium for chromatography was polyamide. The activity of the powder was measured with pyrogallol. The result powder activity was 0.9590 × 10^4U/g. The activity of superoxide dismutase would be affected by the change of temperature, pH and inhibitor. The relationship between the activity of superoxide dismutase and these factors was studied in the experiment. The results showed that when pH was between 7.5 to 8.5, the activity of superoxide dismutase was in a optimum range. Superoxide dismutase activity was sensitive to the change of ambient conditions. The activity would be lost at high temperature. The superoxide dismutase was the most active at the temperature of 25 to 30℃. The activity of superoxide dismutase would decrease obviously under the effect of H_2O_2 and KCN. It was analysed that the superoxide dismutase in Cactus was Cu·Zn-SOD.

Key words: cactus; superoxide dismutase; extract; purification; measure
中图分类号：Q554 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2005)11-0133-04

超氧化物歧化酶(Superoxde dismutase，SOD)[1]，是一种广泛存在于动、植物及微生物中的金属酶。可分为三种类型，第一种类型-Cu·Zn-SOD，呈蓝绿色，主要存在于真核细胞的细胞浆内，分子量在32000左右，由两个亚基组成，每个亚基含1个铜和1个锌。第二种类型-Mn-SOD，呈粉红色，其分子量随来源不同而异，来自原核细胞的分子量约为4000，由两个亚基组成，每个亚基各含1个锰；来自真核细胞线粒体的-Mn-SOD，由4个亚基组成，分子量约为80000。第三种类型-Fe-SOD，呈黄色，只存在于真核细胞中，分子量在38000左右；由两个亚基组成，每个亚基各含1个铁。此外，在牛肝中还存在一种-Co·Zn-SOD。经清华大学生物科学与技术系、香港浸会大学中药现代化研究联合实验室的研究认为，仙人掌中抗衰老成分超氧化物歧化酶(SOD)活性与牛血红蛋白中SOD活性相当，仙人掌中SOD的含量是牛血红蛋白中SOD含量的2倍多，是牛奶SOD含量的7倍多，具有明显的抗衰老和提高机体免疫力作用[2]。鉴于仙人掌中含有SOD，本研究在如何提取仙人掌SOD，并对其活性测定方面进行了初步探讨，为超氧化物歧化酶新资源的开发提供依据。

1 材料与方法

收稿日期：2004-11-12
作者简介：杨洋(1956-)，女，教授，研究方向为天然植物抗氧化活性成分的分离及应用研究。

1.1 材料与试剂

仙人掌 广西农业学校，仙人掌(O.dillenii Haw.)；pH为7.8的0.05mol/L磷酸盐缓冲液；硫酸铵(分析纯)；pH为8.2的0.1mol/LTris—二甲胂酸钠—HCl缓冲液；7mmol/L联苯三酚；聚酰胺100目；其余试剂为国产分析纯或生化试剂，所用试剂皆用重蒸水配制。

1.2 主要仪器

DS-1高速组织捣碎机 上海标本模型厂；PHS-3TC精密数显酸度计 上海沪新电子仪器厂；MP1100 II型电子天平 上海精科天平；752C紫外可见分光光度计、MVS-1旋涡混合器 北京北德科学器材有限公司；AVANTI J-20XPI型高速冷冻离心机 BECKMAN公司；JY92-2D超声波细胞粉碎机；真空冷冻干燥机。

1.3 酶活力测定

采用联苯三酚法测定SOD的活性，以抑制联苯三酚自氧化速率达50%所需要的酶量定义为一个酶单位[3]。

1.4 仙人掌SOD的分离提取

称取新鲜仙人掌500g，将其表面的刺去掉并用双蒸馏水冲洗净，切成小块，加入500ml pH为7.8，H_3PO_4浓度为0.05mol/L的磷酸缓冲液用高速组织捣碎机匀浆后，纱布过滤，收集滤液，滤渣加入200ml pH7.8，H_3PO_4浓度为0.05mol/L的磷酸缓冲液再次匀浆、浸提，合并两次滤液，加入硫酸铵至饱和度45%，4℃静置3h，用高速冷冻离心机8000r/min离心20min，弃去沉淀，收集上清液，加入硫酸铵至饱和度85%，4℃静置过夜。用高速冷冻离心机8000r/min离心40min，弃上清液，沉淀用20ml 5mmol/L、pH7.8的磷酸缓冲液充分溶解，并在pH为7.8，H_3PO_4浓度为5mmol/L的磷酸缓冲液中透析，用超声波细胞粉碎机处理5min，高速冷冻离心机5000r/min的转速下离心5min，除去杂质沉淀，上清液为SOD粗酶液[3,4]。

将粗酶液上预先用磷酸缓冲液平衡的聚酰胺柱(2.6×60cm)，用同样的缓冲液进行洗脱，自动部分收集器收集，控制流速为5ml/10min，每管收集5ml，用752C紫外可见分光光度计测定每管A_{325}值，并用联苯三酚法测定酶活性，具有活性的各管洗脱液合并，经过冷冻干燥得到具有一定纯度的SOD粉末。

1.5 酶的活力计算

样品液单位体积活力：

样品液单位体积活力(U)

={[(0.070-样品液氧化速率)/0.070×100%]/50%}×(2.00/0.01)×样液稀释倍数

总活力：

总活力(U)=单位体积活力(U/ml)×样品液总体积(ml)

1.6 酶种类鉴定

采取抑制剂敏感性实验，分别测定SOD在不同浓度的H_2O_2和KCN抑制下的相对活力[4]。

1.6.1 H_2O_2对SOD活力抑制

取五支洁净试管，分别加入10、20、30、40、50μl ω(H_2O_2)=1.5%的水溶液及1ml SOD酶液，混合均匀后反应30min，测定各管酶液酶活力并计算其相对活力，以重蒸水中酶活力为基准。

1.6.2 KCN对SOD活力抑制

取七支洁净试管，分别加入0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7ml KCN浓度为10mmol/L的水溶液及1ml SOD酶液，混合均匀后反应30min后，立即测定各管酶液酶活力并计算出相对活力，以重蒸水中酶活力为基准。

1.7 温度对酶活的影响[5]

将酶液分别向小试管中加入1ml酶液，在水浴锅中将水温调节到指定值，温度稳定后将小试管放入其中水浴30min，迅速冷却至25℃后，测定酶活力并计算出相对活力。实验中共指定14个温度值，分别是0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65℃，以重蒸水中酶活力为基准。

1.8 pH值对酶活的影响[6]

将酶液分别向小试管中加入1ml酶液及4ml磷酸缓冲液，将混合液pH值调节到指定值，小试管在25℃水浴锅中静置3h，到时间后立即测定酶液酶活力并计算出相对活力。实验中共指定18个pH值，分别是3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5，以重蒸水中酶活力为基准。

2 结果与讨论

2.1 盐的选择

SOD属于蛋白质类物质。蛋白质盐析常用中性盐，主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。其中应用最广的是硫酸铵，其优点是温度系数小而溶解度大(25℃时饱和溶解度为4.1mol/L，即767g/L，0℃时饱和溶解度为3.9mol/L，即676g/L)，在这一溶解度范围内，许多蛋白质和酶都可以盐析出来，分段效果比其他盐好，不容易引起蛋白质变性[7]。因而选用硫酸铵来提取仙人掌中的SOD。

2.2 酶的提取分离

硫酸铵沉淀法正交试验结果见表1和表2。

表1 硫酸铵沉淀法因素与水平[8]

Table 1 The factor and level of sediment way on $(NH_4)_2SO_4$

水平	因素		
	A质量体积比	B第一次加硫酸铵(%)	C第二次加硫酸铵(%)
1	A_1 1:0.5	B_1 40	C_1 80
2	A_2 1:1	B_2 45	C_2 85
3	A_3 1:1.5	B_3 50	C_3 80

表2　$L_9(3^3)$正交试验及结果表

Table 2　The factor and result with $L_9(3^3)$

试验号	正交试验方案			结果	
	A	B	C	粉末质量(g)	酶活力(× 10^4U)
1	A_1	B_1	C_3	0.907	0.862
2	A_1	B_2	C_1	0.923	0.877
3	A_1	B_3	C_2	0.949	0.901
4	A_2	B_2	C_2	1.147	1.101
5	A_2	B_3	C_1	1.092	1.048
6	A_2	B_1	C_3	1.113	1.068
7	A_3	B_3	C_2	1.026	0.964
8	A_3	B_1	C_3	1.033	0.971
9	A_3	B_2	C_1	1.061	0.997
粉 K_1	0.926	1.018	1.025		
末 K_2	1.117	1.044	1.041	由于 $R_A > R_B > R_C$	
质 K_3	1.040	1.021	1.017	因而影响程度	
量 R	0.191	0.026	0.024	A > B > C	
酶 K_1	0.880	0.967	0.974		
活 K_2	1.071	1.013	0.989	由于 $R_A > R_B > R_C$	
力 K_3	0.977	0.971	0.966	因而影响程度	
R	0.192	0.046	0.023	A > B > C	

实验结果表明，使用硫酸铵沉淀法所得到的粉末质量以及粉末具有的酶活力的较好。根据硫酸铵沉淀法正交试验结果，可以得出在提取过程中质量体积比对提取结果的影响最大，第一次加硫酸铵浓度次之，第二次加硫酸铵浓度的影响最小，其中各因素的最佳值为质量体积比1:1，第一次加硫酸铵ω(硫酸铵)=45%，第二次加硫酸铵ω(硫酸铵)=85%。在以上提取条件下可以从500g食用仙人掌中提取到含SOD的粉末1.147g，这些粉末具有的总酶活力为1.101 × 10^4U。

2.3　温度对酶活力的影响

从图1可以得出仙人掌SOD在25～30℃时活力最大，即仙人掌SOD的最适温度在25～30℃之间。随着温度降低酶活力明显降低。在温度超过30℃后，温度越高，酶活力越低。在温度达到60℃以后，测不到酶活力。因此推断仙人掌SOD的失活温度在60～70℃之间。

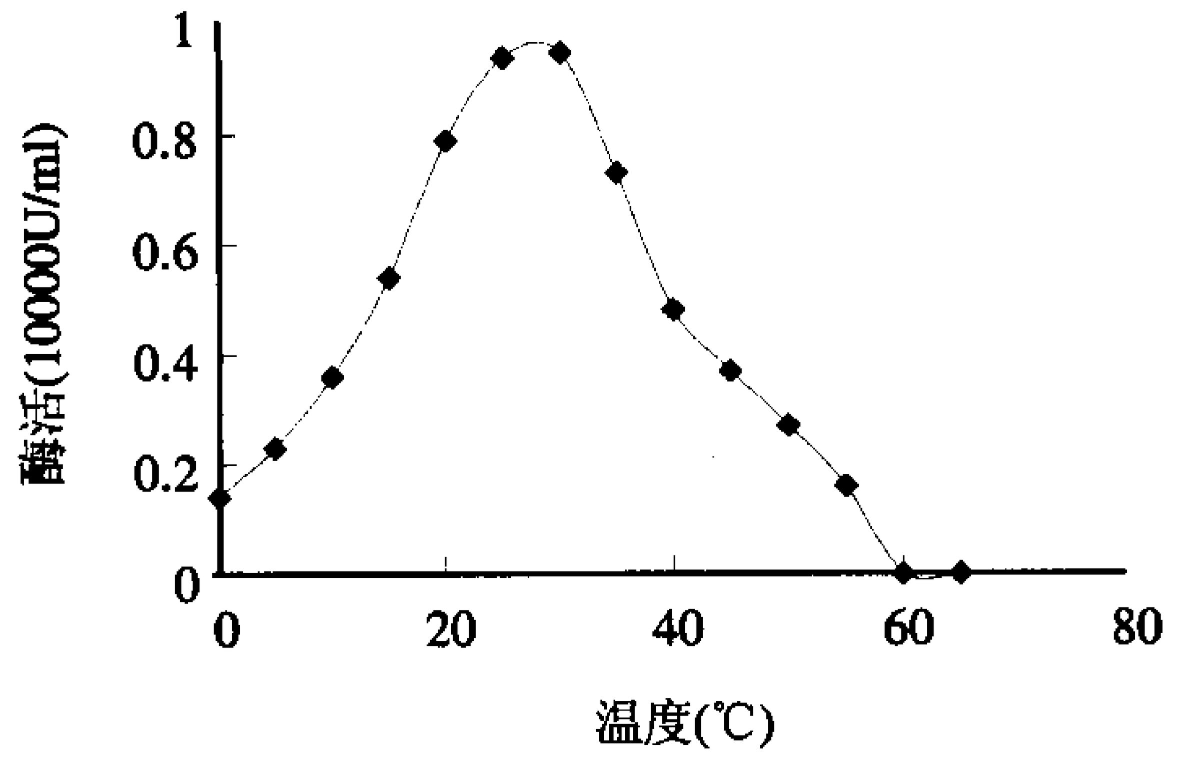

图1　温度对酶活力的影响

Fig.1　The effect of temperature to enzyme activity

2.4　pH值对酶活力的影响

实验结果见图2。在pH值6.0～9.5范围内具有较高的酶活力，特别是在7.5～8.5这一区域酶活力最大且较稳定，表明仙人掌SOD是一种对pH值变化比较稳定的酶，与该酶分子中的金属辅基有关，酶分子中的锌主要起稳定酶分子构象的作用，而铜则与催化机制有关[9]。所以在本次实验中选择pH7.8的缓冲液来提取仙人掌SOD是合适的，这样可以最大程度地避免酶活损失。

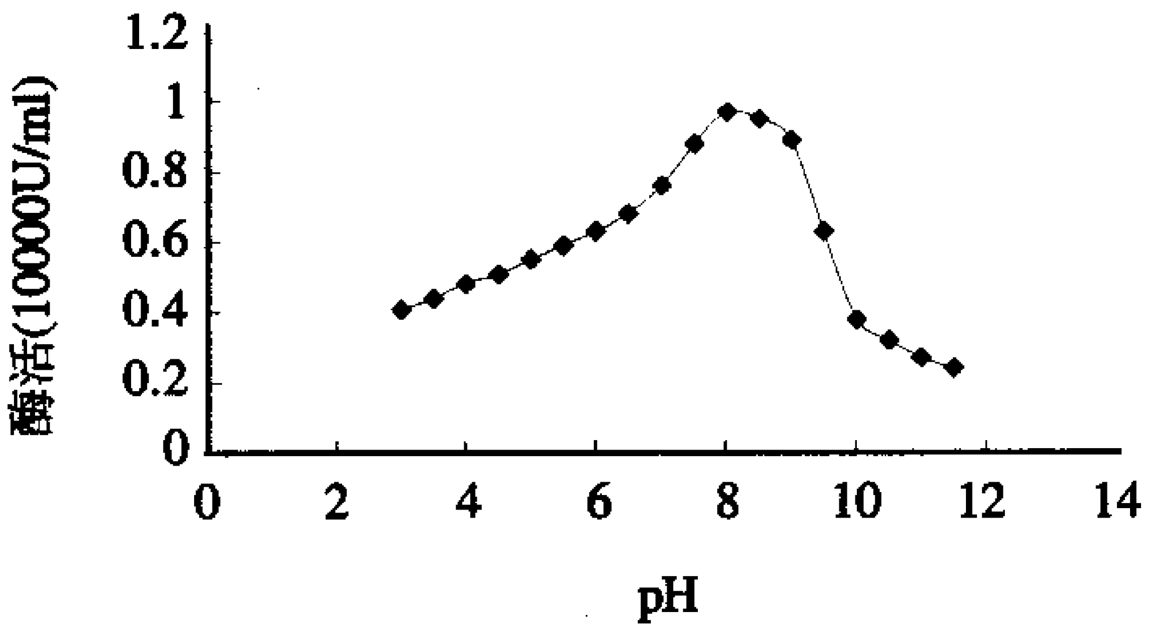

图2　pH值对酶活力的影响

Fig.2　The effect of pH to enzyme activity

2.5　H_2O_2对SOD活力抑制

从实验结果图3可知，加入少量过氧化氢就可以对仙人掌SOD的酶活力产生很强的抑制作用。随着过氧化氢加入量的增大，抑制作用也逐步加强，这表明过氧化氢是SOD的抑制剂，仙人掌SOD对过氧化氢敏感。

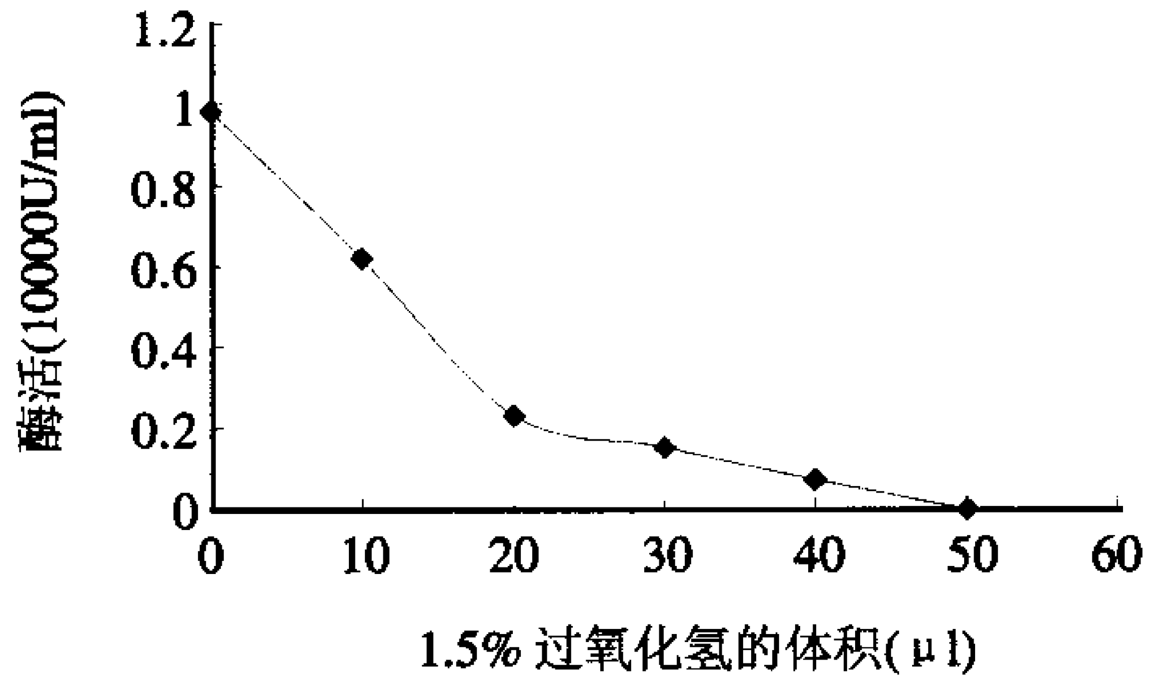

图3　过氧化氢对仙人掌SOD的抑制

Fig.3　H_2O_2 inhibition to SOD from cactus

2.6　KCN对SOD活力抑制

实验结果见图4所示，加入0.1ml 10m mol/L的KCN溶液的SOD样品酶活力明显下降，但是KCN溶液加入量的增大对酶活力的进一步降低作用不明显。尽管如此，实验结果仍表明KCN是SOD的抑制剂[10]。

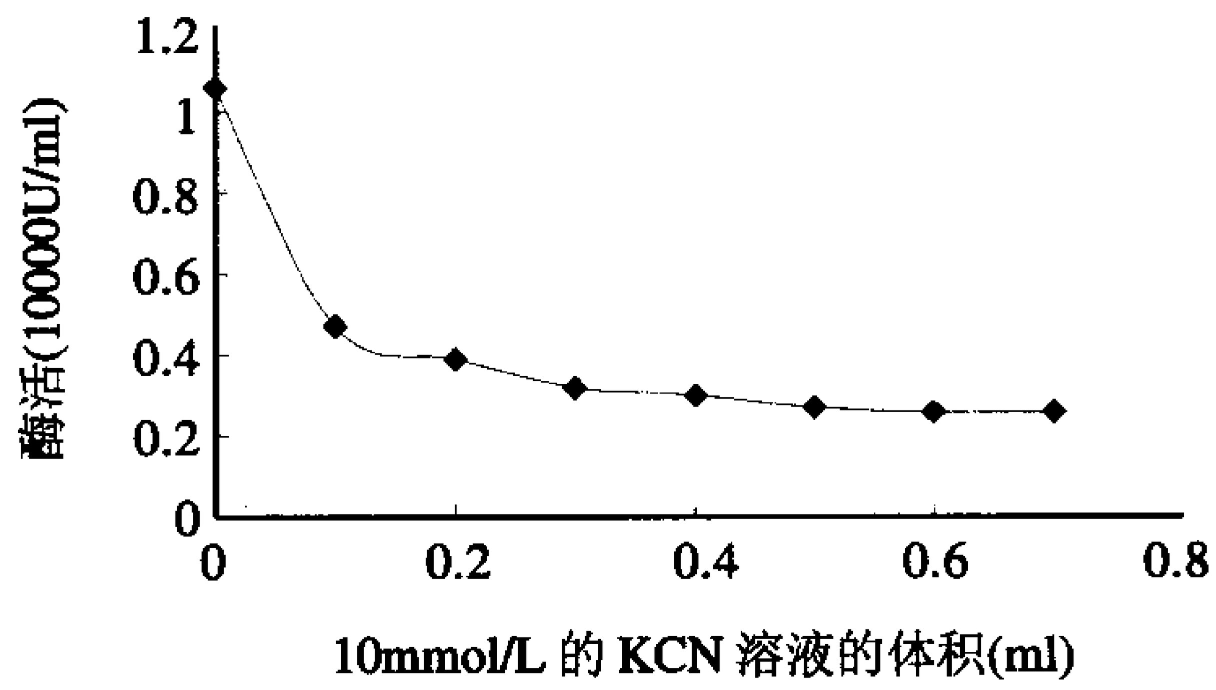

图4　KCN对仙人掌SOD的抑制

Fig.4　KCN inhibition to SOD from cactus

SOD至少可分为三种类型：第一种类型-Cu·Zn-SOD，由两个亚基组成，每个亚基含1个铜和1个锌，对氰化物和过氧化氢均敏感。第二种类型-Mn-SOD，由两个亚基组成，每个亚基各含1个锰，对氰化物和过氧化氢均不敏感；第三种类型-Fe-SOD，由两个亚基组成，每个亚基各含1个铁，对氰化物不敏感。根据这一理论我们选用ω(H_2O_2)=1.5%的水溶液和10mmol/L的KCN溶液对仙人掌SOD进行测定，以仙人掌SOD的酶活力是否会受这两种物质的抑制为依据判断仙人掌SOD的种类。由实验结果知道从仙人掌中提取的SOD样品受到氰化钾和过氧化氢作用，活力明显降低，即对氰化物和过氧化氢均敏感，因此可以判断从仙人掌中提取的SOD属于Cu·Zn-SOD[9]。

3 结 论

3.1 使用硫酸铵沉淀法提取仙人掌SOD在提取过程中质量体积比对提取结果的影响最大，第一次加硫酸铵次之，第二次加硫酸铵的影响最小，在一定提取条件下可以从500g食用仙人掌中提取到含SOD的粉末1.147g，这些粉末具有的总酶活力为1.1×10^4U，即0.9590×10^4U/g粉末。

3.2 仙人掌SOD的最适温度在25～30℃之间。在最适温度范围以外，温度的降低或升高都会引起酶活力的降低。仙人掌SOD的失活温度在60～70℃之间。

3.3 仙人掌SOD在pH值6.0～9.5范围内具有较高的酶活力，特别是在7.5～8.5这一区域酶活力最大且较稳定。提取仙人掌SOD应选择pH7.8的缓冲液。

3.4 加入少量的H_2O_2溶液或KCN溶液都可以对仙人掌SOD的酶活力产生很强的抑制作用。仙人掌SOD样品对氰化物和过氧化氢均敏感，因此可以判断从仙人掌中提取的SOD属于Cu·Zn-SOD。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 北京现代实用本草[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 176.

[2] Yim M, Boon Chock P Stadtman E. Enzyme function of copper zinc superoxide dismutase as a free radical generator [J]. J Bio Chem, 1993, 268(6): 4099.

[3] 袁勤生. 超氧化物歧化酶的分析测定[J]. 中国医药工业杂志, 1989, 20(10): 473-477.

[4] 余旭亚. 超氧化物歧化酶的分离纯化及鉴定[J]. 云南化工, 2000, (6): 17-19.

[5] 姜锡瑞. 酶制剂应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 167-174.

[6] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1990. 129-132.

[7] 袁勤生. 应用酶学[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1994. 231-237.

[8] 王荣梅. 数理统计[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 1986. 148-164.

[9] 陈浩, 朱利民, 袁勤生. Cu·Zn-SOD的某些理化性质比较研究[J]. 生化药物杂志, 1991, 55(1): 27-30.

[10] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 173-176.

信 息

安捷伦科技在亚洲推出Agilent TC和Agilent HC反相高效液相色谱柱

2005年10月安捷伦科技宣布正式向中国市场推出Agilent TC和Agilent HC反相高效液相色谱(HPLC)柱。最新的色谱柱拥有卓越性能、持久耐用等特点。

HPLC用于分离、分析各种化合物，包括合成和天然产品、药品和毒素。Agilent TC和Agilent HC反相高效液相色谱柱是为了满足广泛的应用范围而研制的，例如环境分析、食品安全和包括中药在内的药品质量监控。

Agilent TC和Agilent HC反相高效液相色谱柱目前有两种类型：通用碳载量或高碳载量。所有的色谱柱都提供较大的表面积和pH范围，能够对各种极端复杂的样品进行分析。Agilent TC和Agilent HC反相高效液相色谱柱具有持久的性能，整个使用期间几乎不需要进行任何维护，可与所有标准高效液相色谱仪配合使用，且丝毫不影响使用质量及可靠性。