

鹅红细胞 Cu, Zn-SOD 分离纯化 及部分性质的研究

张兰杰¹, 辛 广¹, 张维华¹, 袁勤生²

(1. 鞍山师范学院化学系, 辽宁 鞍山 114005; 2. 华东理工大学生命科学院, 上海 200237)

摘 要: 经氯仿-乙醇分级分离, 丙酮沉淀及 DE-32 纤维素柱层析的方法, 从鹅红细胞中得到纯化的 Cu, Zn-SOD。结果表明此酶的比活力为 10656.14U/mg, 提纯倍数为 354.73, 聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白带与活性带相对应。相对分子量约为 32000, 相对亚基分子量约为 16000。最大紫外吸收波长为 258nm, 对 KCN 和 H₂O₂ 敏感, 最适 pH 为 6~9, 热稳定性在 60℃ 以下。

关键词: 鹅红细胞; Cu, Zn-SOD; 纯化; 性质

Studies on Purification and Properties of Superoxide Dismutase from Geese Erythrocytes

ZHANG Lan-jie¹, XIN Guang¹, ZHANG Wei-hua¹, YUAN Qin-sheng²

(1. Department of Chemistry, Anshan Normal University, Anshan 114005, China

2. East China University of Science Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Copper/zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) from geese erythrocytes has been purified by chloroform-ethanol fractionation, acetone precipitation and DE-32 chromatography. The results showed that the specific activity of the enzyme was 10656.14U/mg, and its purification factor was 354.73. This enzyme had two identical subunits. The molecular weight was about 32000, and the identical subunit molecular weight about 16000. And the ultraviolet absorption peak of the enzyme was found at 258nm. The enzyme was sensitive to KCN and H₂O₂, the enzyme optimum pH was from 6 to 9, stable below 60℃.

Key words: geese erythrocytes; Cu, Zn-SOD; purification; property

中图分类号: Q291

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0086-04

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, 缩写 SOD, EC.1.15.1.1), 是一类催化超氧阴离子自由基(O₂⁻)发生歧化反应的金属酶, 至 1969 年由 Mccord 和 Fridovich^[1]发现此酶以来, 有关 SOD 在生物界的分布及特性的研究倍受重视。研究表明 SOD 与人体多种疾病的防治有关^[1]。它可以治疗多种炎症、自身免疫性疾病、防止缺血-再灌注损伤, 它还有抗衰老、防止皮肤色素沉着等作用。SOD 也是药品、饮料、保健品、化妆品等的添加剂。

鹅又叫家雁, 它的祖先是鸿雁(*Anser cygnoides*), 现在全国各地都有饲养, 它的肉、卵都有丰富的营养。它的血味咸、性平、微毒、解金属及药毒^[2], 民间常用于延年益寿、美容等功效。本文首次报导了鹅红细胞 Cu, Zn-SOD 的分离纯化及部分特性的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜鹅血 鞍山启明农贸市场 DE-32 Whatman 公司 连苯三酚 贵州遵义第三化工厂; 标准蛋白质 上海东风生化试剂厂; Sephadex G-75 Pharmacia 公司, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

CR22E 高速冷冻离心机 日本东芝; TU-1020 紫外分光光度计; 电泳仪 北京六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 SOD 的分离与纯化

取新鲜鹅血 100ml, 加柠檬酸三钠抗凝, 离心收集红细胞约 50ml, 用 0.9% 氯化钠溶液洗涤三次, 加等量

收稿日期: 2004-12-31

作者简介: 张兰杰(1957-)女, 教授, 主要从事生物化学教学与科研。

的4℃预冷的蒸馏水搅拌溶血30min, 缓慢加入4℃预冷的0.25倍体积95%的乙醇, 再缓慢加入4℃预冷的0.15倍体积的氯仿搅拌15min, 冷冻离心($8000 \times g$ 4℃)20min, 去血红蛋白沉淀, 收集上清液约80ml。加入 K_2HPO_4 (按43g/100ml上清液的比例), 静置15min分层, 收集乙醇-氯仿相(微混浊), 冷冻离心去沉淀($8000 \times g$ 4℃15min)得清液约40ml。放入55℃恒温水浴中20min, 迅速冷却, 离心去沉淀。向清液加入4℃预冷的0.75倍体积的丙酮, 冷冻离心($10000 \times g$ 4℃, 20min), 收集沉淀。用少量的双蒸水溶解沉淀, 并对pH7.6, 2.5mmol磷酸钾缓冲液在4℃下透析24h, 更换透析外液4~5次。冷冻离心去沉淀($8000 \times g$ 4℃15min), 其清液用聚乙二醇浓缩至4ml。上DE-32层析柱(柱体为 1.5×60 cm)。用pH7.6, 2.5~200mmol/L(100ml)磷酸钾缓冲液进行梯度洗脱, 流速为20ml/h, 每管收集3ml, 收集具有SOD活性峰的部分洗脱液, 动态透析除去无机盐, 冷冻干燥得蓝绿色、粉末状酶剂。

1.3.2 酶活力测定

采用微量连苯三酚自氧化法^[3]。以每毫升反应液中每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达50%的酶量定义为一个酶活力单位。

1.3.3 蛋白质浓度测定用Lowry法^[4]

1.3.4 紫外吸收光谱测定

取纯化的酶, 溶于适量的双蒸水, 用TU-1020型紫外分光光度计220~350nm进行扫描。

1.3.5 产品纯度鉴定

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 胶浓度为7.5%, 电极缓冲液为pH8.3的Tris-Gly缓冲液, 考马斯亮蓝R-250染色。电泳谱活性染色采用氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, 简称NBT)一核黄素光化还原法^[5]。

1.3.6 分子量和亚基分子量测定^[6]

分子量测定, 采用Sephadex G-75凝胶过滤法, 柱体为 1.0×90 cm, 流速为3ml/20min, 分别以牛血清蛋白(M67000), 鸡卵清蛋白(M43000), 胰凝乳蛋白酶原(M25000), 牛结晶胰岛素二聚体(M12000)为标准品, 亚基分子量测定用SDS-PAGE凝胶电泳法, 凝胶浓度为7.5%, 分别以磷酸化酶(M94000), 肌动蛋白(M43000), 烟草花叶病毒外壳蛋白(M17500), 细胞色素C(M12500)为标准品, 计算其 R_f 值。

1.3.7 酶种类的鉴定

采用抑制敏感性实验, 分别测定SOD在不同浓度的 H_2O_2 和KCN的抑制下相对酶活力。

1.3.7.1 H_2O_2 对酶活力的抑制

取6支干净试管, 各加入1.5%的 H_2O_2 10、15、

20、25、30 μ l及适量的酶液, 双蒸水补足3ml, 30℃水浴恒温30min, 迅速冷却到25℃, 以双蒸水中的酶活力为标准, 计算相对酶活力。

1.3.7.2 KCN对酶活力的抑制

取6支干净试管, 各加入10mmol KCN 100、200、300、400、500 μ l及适量的酶液, 以双蒸水补足3ml, 30℃水浴恒温30min, 迅速冷却到25℃, 以双蒸水中的酶活力为标准, 计算酶相对活力。

1.3.8 温度对酶活力的影响

取6支干净试管, 分别加入适量的SOD酶液, 以双蒸水补足3ml, 分别置于30、40、50、60、70、80℃水浴恒温30min, 取出迅速冷却到25℃, 以25℃的酶活力为标准, 计算酶相对活力。

1.3.9 pH对酶活力的影响

pH为3、4、5、6、7、8、9、10、11的缓冲溶液3ml, 加入等量的酶液, 在25℃恒温水浴中保温30min, 以双蒸水中的酶活力为标准, 计算相对酶活力。

2 结果与分析

2.1 酶的活力回收

鹅血100ml提取液, 酶的总活力为46532U, 经纯化后的总活力为24296U, 比活为10656.14U/mg蛋白, 纯化结果见表1, DE-32柱层析洗脱曲线见图1。

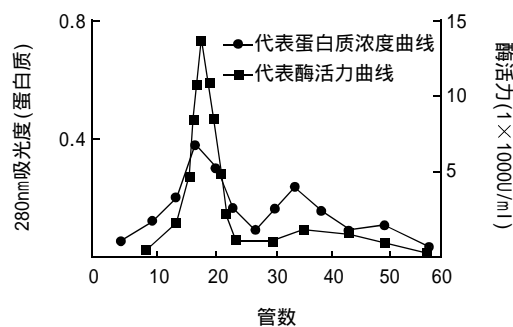


图1 鹅红细胞Cu, Zn-SOD在DE-32色谱中的纯化

Fig.1 The purification of Cu, Zn-SOD in DE-32 chromatography from geese erythrocytes

表1 鹅红细胞Cu, Zn-SOD的纯化

Table 1 The purification of Cu, Zn-SOD from geese erythrocytes

步骤	总体积 (ml)	总活力 (U)	总蛋白 (mg)	比活 (U/mg 蛋白)	活力回收 (%)	纯化 倍数
溶血液	100	46532	576	80.78	100	1
乙醇-氯仿相	80	37834	552	68.54	81.31	2.28
热变性(55℃)	40	32521	308	105.56	69.88	3.51
丙酮沉淀部分	20	30683	29	1058.03	65.94	34.80
DE-32柱层析洗脱液	18	24296	2.28	10656.14	52.21	354.73

2.2 酶的纯度鉴定

经上述纯化的过程获得的酶在聚丙烯酰胺凝胶电泳谱图上显出两条蛋白带(如图2A),但活性染色在两条蛋白带的位置均呈现表示活性的亮斑(如图2B),表明这两条带的蛋白质都是SOD。SOD在电泳谱图上显出两条蛋白带,可能是由于存在电荷异构体所产生的现象^[7]。

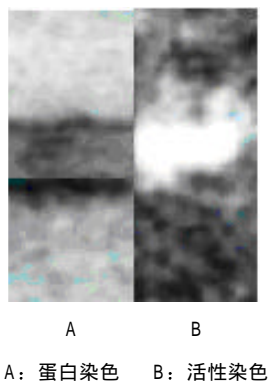


图2 鹅红细胞 Cu,Zn-SOD SDS-PAGE 图谱

Fig.2 Graph of polyacrylamide gel electrophoresis of Cu,Zn-SOD from geese erythrocytes

2.3 酶种类的鉴定

有文献报道^[7], Mn-SOD 对氰化物和过氧化氢均不敏感, Cu,Zn-SOD 对氰化物和过氧化氢均敏感, Fe-SOD 对氰化物不敏感,因此可用这两种抑制剂将这三种 SOD 分开。由图3、4可知 1.5%的 H_2O_2 10 μ l 和 10mmol/L KCN/L 100 μ l 对此 SOD 活性均有明显抑制作用,由提取方法可

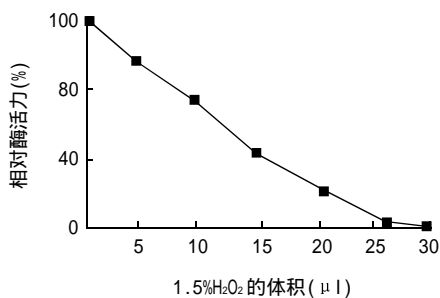


图3 H_2O_2 对鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 的影响

Fig.3 Effect of H_2O_2 on Cu,Zn-SOD from geese erythrocytes

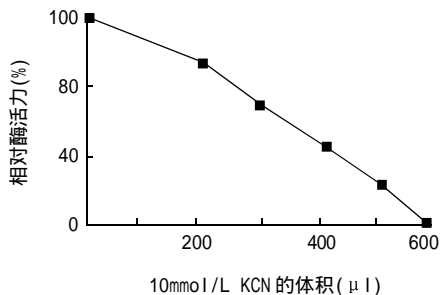


图4 KCN 对鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 的影响

Fig.4 Effect of KCN on Cu,Zn-SOD from geese erythrocytes

知乙醇-氯仿混合液对此酶无影响,相反 Mn-SOD、Fe-SOD 可被乙醇-氯仿混合液破坏。因此可推断鹅红细胞 SOD 属 Cu,Zn-SOD。

2.4 酶的性质

2.4.1 酶的紫外吸收光谱,用 TU-1021 型紫外分光光度计测得此酶的最大紫外吸收波长为 258nm(如图5所示),这与 McCord 和 Fridovich^[1]报导的牛红细胞 Cu,Zn-SOD 结果基本一致。

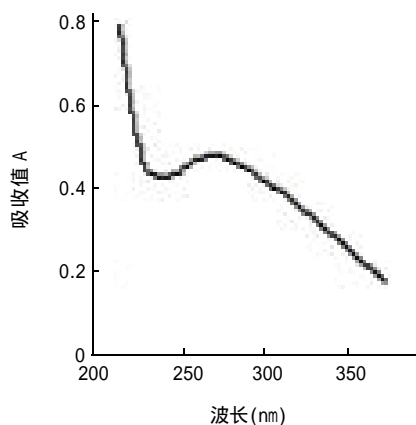


图5 鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 紫外吸收光谱

Fig.5 Ultraviolet absorption curve of Cu,Zn-SOD from geese erythrocytes

2.4.2 酶分子量与亚基分子量

目前所报导的 Cu,Zn-SOD 均由两个相同的亚基组成,我们纯化的酶,用 Sephadex G-75 凝胶过滤法,测得鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 的分子量约为 32000D,结果见图6。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得鹅红细胞 SOD 的亚基分子量 M 约为 16000D,结果见图7。说明鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 也是由两个相同的亚基组成。

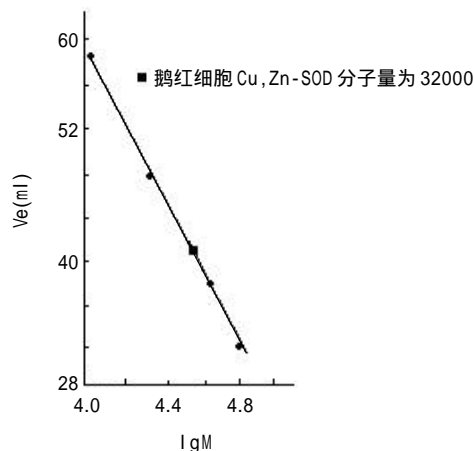


图6 鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 相对分子质量

Fig.6 Relative molecular quality of Cu,Zn-SOD from geese erythrocytes

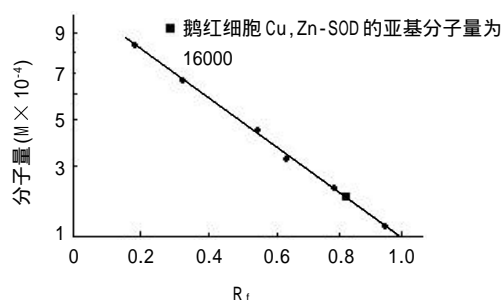


图7 鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 相对亚基分子质量

Fig.7 Relative subunit molecular quality of Cu,Zn-SOD from geese erythrocytes

2.4.3 酶的热稳定性

由实验结果可知,该酶在 30、40、50℃保温 30min,其酶活性基本保持不变,在 60、70、80、90℃保温 30min 其相对酶活力降到 90%、80%、70% 和 40%,说明鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 在 30~60℃范围内,具有较好的稳定性。

2.4.4 pH 对酶活性的影响

由实验结果可知,在 pH3~6 范围内,相对酶活力随 pH 值升高而增大;在 pH6~9 范围内,此酶的相对酶活力达到最大且较稳定;在 pH9~11 范围内,此酶的相对酶活力随 pH 值升高而降低;表明此酶对 pH 的适应范围较广。

2.4.5 某些化学试剂对酶活性的影响

由实验结果可知,SDS 对鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 的抑制作用不明显,EDTA 对此酶的活力有一定的影响;H₂O₂ 对此酶活力能明显的抑制。

3 讨论

鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 对热、SDS 具有一定的稳定性,其原因一方面与其是金属酶类有关,另一方面与其自身结构有关。据报道^[8]Cu,Zn-SOD 球蛋白分子的两个相同的亚基是通过非共价键疏水作用而相互结合的,亚基结构是由八股反平行的 β-折叠围成的圆筒状结构,此结构较稳定。

鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 在 pH6~9 的范围内较稳定,这种稳定性可能与该酶的金属辅基有关。在较低的 pH 条件下(pH4)酶分子的大部分锌从结合位点解离,而在较高的 pH 条件下可能是酶分子中的两个金属位点被铜占据,从而使酶分子的构型发生不可逆的转变,并丧失其活性。一般认为,SOD 中的锌主要起稳定酶分子的作用,而铜则与催化机制有关^[9]。

鹅红细胞 Cu,Zn-SOD 对 H₂O₂ 敏感,2mmol/L H₂O₂ 存在的条件下、3min 使此酶的活性损失 50%,使酶失活的主要原因主要是由于 H₂O₂ 能使 Cu²⁺ 转变成 Cu⁺,使 Cu²⁺ 转逐渐减少。Cu²⁺ 是 Cu,Zn-SOD 发挥催化作用不可缺少的,并且 Cu⁺ 可以与 H₂O₂ 通过 Fenton 反应形成 Cu²⁺ 和 -OH, -OH 又攻击与 Cu²⁺ 配位的组氨酸的残基,使酶迅速失活^[10]。EDTA 作用时间延长,也能使酶的活性受到损失,其主要原因是由于 EDTA 是一种金属螯合剂,它的存在使 Cu,Zn-SOD 中的金属离子损失,而降低酶的活性。

本实验在提取方法上采用热变性、有机溶剂沉淀,而只用一次 DE-32 纤维素柱层析,分离纯化了鹅红细胞 Cu,Zn-SOD,过程简单。实验结果表明鹅红细胞含有较高活性的 Cu,Zn-SOD,为进一步开发鹅血的营养及药用价值提供了依据。

参考文献:

- [1] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte protein[J]. J Biol Chem, 1969, 244:6049-6055.
- [2] 李时珍.本草纲目[M].重庆:重庆大学出版社,1998,476-477.
- [3] 谢卫华,姚菊芳,袁勤生.连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进[J].医药工业,1988,19(5):217-219.
- [4] Lowry OH, Roschrough NJ, Farr A, et al. Protein measurement with the folin phenol[J]. Biol Chemistry, 1955, 193:265-275.
- [5] 罗广华,王爱国.植物SOD凝胶电泳及活性显示[J].植物生理学通讯,1988,(6):44-45.
- [6] 张龙翔,张廷芳,李令媛.生化实验方法和技术(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1997,100-123.
- [7] 邹国林,罗时文,袁名宜.小白菜线粒体锰超氧化物歧化酶的纯化和性质研究[J].生物化学与生物物理学报,1992,24(2):180-183.
- [8] Tainer JA, Getzoff ED, Richardsom JS, et al. Structure and mechanism of copper zinc superoxide dismutase[J]. Nature, 1983, 306: 284-287.
- [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] Mavelli L, Ciriollo MR, Rotilio G. Multiple electrophoretic variants of Cu,Zn-SOD as an expression of the enzyme aging. Effects of H₂O₂, ascorbate and metal ions[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1983, 117: 677-681.