

牛血铜锌超氧化物歧化酶分离提取新工艺

张 良¹, 薛 刚², 张彩莹³, 黄开勋¹

(1.华中科技大学化学系, 武汉 430000; 2.南阳理工学院, 河南 南阳 473004;

3.南阳师范学院, 河南 南阳 473000)

摘 要: 在传统制备超氧化物歧化酶的基础上, 进行工艺改进。直接用血块, 采用机械破碎法破膜, 热变性及两次乙醇-氯仿沉淀除杂蛋白, 然后丙酮沉淀, 按照此工艺分离提取获得高纯度的 Cu,Zn-SOD, 比活达到 6988U/mg · pro。

关键词: 牛血; 铜锌超氧化物歧化酶(Cu,Zn-SOD); 分离提取; 新工艺

Extraction New Technology of Bovine Blood Copper and Zinc Superoxide Dismutase (Cu, Zn-SDD)

ZHANG Liang¹, XUE Gang², ZHANG Cai-ying³, HUANG Kai-xun¹

(1.Department of Chemical, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430000, China;

2.Nanyang Scinece and Technology College, Nanyang 473004, China;

3.Nanyang Normal College, Nanyang 473000, China)

Abstract: A new procedure is designed based on the conventional method. Higher purity Cu,Zn-SOD is obtained by thermal denaturalization, twice ethanol-chloroform to remove other protein, acetone precipitation. Its specific activity is 6988U/mg · pro.

Key words: bovine blood; copper and zinc superoxide dismutase(Cu,Zn-SOD); extraction; new technology

中图分类号: TS201.25

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2004)08-0121-04

超氧化物歧化酶(SOD)是广泛存在于生物体内的一类金属酶, 按其所含金属离子的不同至少分为三种: Cu,

Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD^[1]。自 1969 年 McCord 和 Fridovich^[2]发现该酶并阐明其生物学功能以来, 有关的理论和应用研究迅速发展。现已证实, SOD 不仅在生物体内对抗氧化、解毒等起重要作用, 而且也有抗辐射、抗肿瘤及抗衰老等功能^[3], 因而受到医药界的极大关注。

收稿日期: 2003-11-03

作者简介: 张良(1970-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为生物化学。

由表 9、10 样品分析结果表明, 食用花卉中 Zn 的可溶性糖类结合态的形态分布为 14% 左右, 食用花卉中 Zn 的蛋白质结合态含量分布比可溶性糖类结合态更多, 而且 Zn 的蛋白质结合态与可溶性糖类结合态含量分布差异较明显; 另外值得注意的是, 三种食用花卉中 Zn 的可溶性糖类结合态的含量分布相对较固定, 这说明 Zn 的形态之间存在着一定的平衡关系, 这为我们进行深入的形态分析研究提供了基础。

参考文献:

[1] 颜世铭, 洪昭毅, 李增禧. 实用元素医学[M]. 河南: 河南

医科大学出版社, 1999.

[2] 王夔. 生命科学中的微量元素[M]. 北京: 中国计量出版社, 1995.

[3] 李时珍. 本草纲目[M]. 中国中医药出版社, 1998.

[4] 药食两用花卉中营养元素的光谱测定[M]. 光谱学与光谱分析, 2000.

[5] 食用花卉中微量元素 Zn 的初级形态分析[M]. 光谱实验室, 2001.

[6] 食用花卉中微量元素 Fe、Zn 的蛋白质态分布[M]. 光谱实验室, 2002, (3).

[7] 袁东星, 等. 化学形态分析[R]. 分析测试通报, 1992, (4).

迄今为止,人们已经从多种动物组织、植物组织和微生物体内提取了SOD,并对其性质进行了研究。从动物血液中制备SOD的方法已报道了很多^[4],其基本工艺流程为:血液预处理,洗涤红细胞和溶血;用有机溶剂去除大部分杂蛋白得SOD粗制品;再经柱层析分离得到成品。但这些方法处理量小、纯化效率低、周期长。为了建立一个经济而有效的分离提取方法,本文在实验中利用血块采用机械破碎法破膜,采用热变性及两次乙醇-氯仿沉淀去除杂蛋白,然后用丙酮沉淀得到Cu,Zn-SOD成品,经活性和纯度检验结果令人满意,此工艺适用于工业化生产。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜牛血采自南阳市肉联厂。

1.2 试验试剂

丙烯酰胺 日本进口分装,上海源聚生物科技有限公司;N,N-亚甲基双丙烯酰胺 Fluka;考马斯亮蓝R-250 进口分装,上海化学试剂公司;Triton X-100 Amresco0694;三羟甲基氨基甲烷 美国进口分装,中国医药公司北京采购站;低分子量标准蛋白质;邻苯三酚等。

1.3 试验设备

UV-2100 紫外分光光度计,UNICO;JM-250 电泳仪;垂直板电泳槽,Mini-V8·10(GIOBCO BRL);LXJ-Ⅱ B 离心沉淀机;胶体磨等。

1.4 试验方法

1.4.1 所需试剂的配制(按10000g牛血所需试剂的量)

保护剂:配制1.5%乳糖溶液1500ml,备用。

溶酶剂:配制2000ml其中含Triton X-100 3%、异丙醇0.5%溶液,充分搅拌使其溶解,备用。

激活剂:配制20%硫酸铜溶液1000ml,备用。

乙醇-氯仿:按乙醇:氯仿=5:3混合,冷却备用。

1.4.2 Cu,Zn-SOD的分离提取工艺

新鲜牛血(自然凝固),分割成小块,加入15%的保护剂和25%的溶酶剂,用胶体磨粉碎;离心(3000r/min,15min)收集上清液;加入3%激活剂于62℃条件

下热变性,保温10~15min,离心收集上清液;缓慢加入40%(体积比)的预冷乙醇-氯仿的混合液,搅拌15min,离心收集上清液;再次加入20%(体积比)乙醇-氯仿沉淀,离心去除沉淀;在上清液中加入等体积预冷的丙酮,4℃时放置2h,离心收集沉淀;冷冻干燥即得到淡蓝绿色的成品。

1.4.3 酶活性测定

采用微量的连苯三酚自氧化法^[5]。

活力单位定义:25℃,1ml反应液中每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达50%时的酶量为一个活力单位。

1.4.4 蛋白质浓度测定

用Folin-酚试剂法(Lowry法)^[6]。

1.4.5 亚基相对分子量测定

采用不连续系统的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法^[7]。

1.4.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用不连续系统的垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)^[8]。

1.4.7 紫外吸收光谱

用紫外分光光度计在波长200~300nm进行扫描,测定其最大吸收峰处的波长。

1.4.8 酶的铜、锌含量测定

纯化后样品经硝酸和高氯酸消化后用IRIS-1000全谱直读等离子体发射光谱仪测定铜和锌的含量,并换算成每个亚基所含铜和锌的原子数。

2 结果与讨论

2.1 Cu,Zn-SOD的活力回收和酶比活

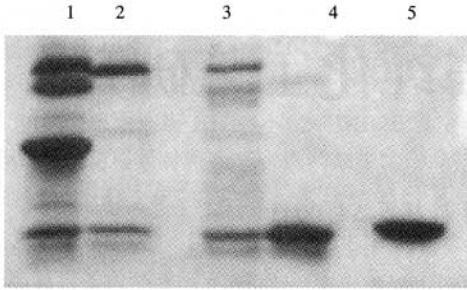
本实验以10000g新鲜牛血为例,采用上述工艺分离提取Cu,Zn-SOD,分离提取过程中Cu,Zn-SOD的总活性和比活性变化见表1。最终得到Cu,Zn-SOD 1.8g,比活为6988U/mg·pro,图1为提取过程中样品的SDS-PAGE比较。

2.2 Cu,Zn-SOD的纯度分析及亚基相对分子量

经上述步骤获得的酶制品在PAGE时显示两条蛋白带,活性染色在两条蛋白带对应的位置均呈现出表示活

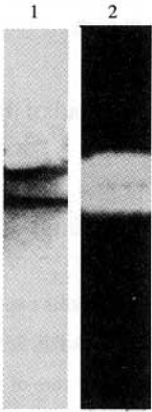
表1 牛血红细胞Cu,Zn-SOD的分离提取

步骤	总活力($\times 10^4$ U)	总蛋白($\times 10$ mg)	比活(U/mg·pro)	纯化倍数	回收率(%)
破碎离心	88	2500	35.2	1	100
热变性	81.2	260	312.3	8.87	92.3
乙醇-氯仿沉淀	76.8	99.1	775.0	22.02	87.3
第二次乙醇-氯仿沉淀	75.4	84.7	879.6	25.0	85.7
丙酮沉淀	60.1	8.6	6988	198.52	68.3



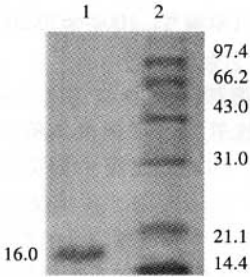
1.破碎离心后 2.热变性 3.乙醇-氯仿沉淀
4.第二次乙醇-氯仿沉淀 5.丙酮沉淀

图1 牛血Cu,Zn-SOD纯化过程中SDS-PAGE分析



1.考马斯亮蓝染色 2.NBT和核黄素染色

图2 牛血Cu,Zn-SOD的PAGE



1.纯化的Cu,Zn-SOD 2.低分子量标准蛋白质

图3 牛血Cu,Zn-SOD的SDS-PAGE

性的亮斑,表明这两条带都是牛血Cu,Zn-SOD(见图2),同时表明酶的纯度已达到电泳纯。得到的酶制品通过SDS-PAGE用考马斯亮蓝R-250染色呈现一条蛋白带(见图3),参照低分子量标准蛋白质,计算得出此Cu,Zn-SOD的亚基相对分子量约为16.0kDa,与文献报道^[9]的亚基相对分子量15.0~17.0kDa相一致。

2.3 紫外吸收光谱

牛血Cu,Zn-SOD的最大吸收波长为260nm(见图4),与文献报道^[9]的(250~270nm)一致。

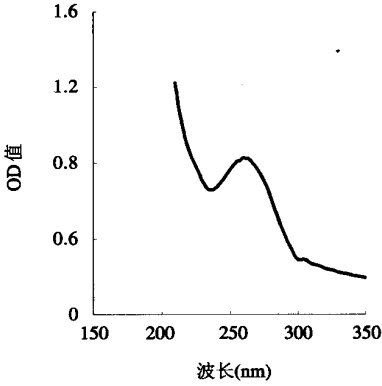


图4 牛血Cu,Zn-SOD的紫外吸收光谱

2.4 铜、锌元素含量测定

酶溶液浓度为1.634mg/ml,测定铜含量为:67μg/ml,锌含量为:86μg/ml。依据Cu,Zn-SOD的亚基相对分子量为16.0kD,经换算每个亚基约含有一个铜原子和一个锌原子。与文献报道的相一致^[9]。

3 结论

从表1可见,按照此分离提取工艺所获得Cu,Zn-SOD的比活可达到6994U/mg·pro,活性回收率为68.3%,纯度达到电泳纯。由于加入保护剂及溶酶剂,使酶活性丧失较少;直接用血块提取省去了传统工艺中血液抗凝以及红细胞和血浆的分离过程,减少有机溶剂用量,采血、分离过程简化;采用机械破碎法破膜,改变了利用蒸馏水使渗透压改变离心破膜手段,工艺经济、操作性强;同时,在传统工艺中,需要通过柱层析进一步纯化,工艺复杂,原料处理量小。综上所述,运用此工艺可以缩短了工艺时间,原料处理量大,有机溶剂用量少,且产品回收率高,适合于工业化生产。

参考文献:

[1] 袁勤生.现代酶学[M].上海:华东理工大学出版社,2001.
[2] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase on enzymic function for erythrocuprein[J].J Biol Chem,1969, 244: 6049-6055.
[3] 袁勤生.我国SOD的应用研究热点和问题[J].中国医药工业杂志,1994,25(5): 227-231.
[4] 刘栋,张秀珍,叶民,等.动物血来源超氧化物歧化酶的制备及其制剂[J].中国药学杂志,1998,33(12): 708-710.
[5] 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.
[6] Lowry O H, Roscrough N J, Farr A, et al. Protein measure-

葛根中异黄酮的提取与纯化工艺研究

杨世军, 张会香, 周怡静

(桂林工学院材料与化工系, 广西 桂林 541004)

摘 要: 本文研究了葛根中异黄酮的最优浸提条件和最佳工艺参数, 并对提取液的纯化条件进行了研究, 最后对纯化产物进行了定性鉴定。结果表明: 乙醇浸提法最佳提取工艺参数为: 料液比 1:8、75% 乙醇、温度 70℃、提取时间 2.0h; 水提取法最佳浸提工艺参数为: 料液比 1:10, 浸提时间 3h, 浸提温度 100℃, 提取次数 3 次。葛根中异黄酮的纯化采用氯化钠盐析法, 醇提液的纯化产率可达 4.96%, 产品含量为 33.84%; 水提液的异黄酮产率为 6.45%, 含量为 10.50%。

关键词: 葛根; 异黄酮; 提取; 纯化

Study on the Optimum Extraction and Purification Technology of Isoflavonoid of Pueraria Lobata

YANG Shi-jun, ZHANG Hui-xiang, ZHOU Yi-jing

(Department of Material Science and Chemistry, Guilin Institute of Technology, Guilin 541004, China)

Abstract: The optimal extraction and purified technology of pueria isoflavonoid were studied in this experiment. The results showed that the optimum conditions of the isoflavone extraction rate of material to using alcohol as 1:8, 75% alcohol for 2h and at the temperature of 70℃. The optimum conditions of the isoflavone extraction by using water: rate of material to water as 1:10 for 3h and at the temperature of 100℃ with 3 times. The results of purifying with NaCl showed that the yield of alcohol extracted isoflavonoid was over 4.96%, and the content of isoflavonoid was isoflavonoid 33.84%, the yield of water extracted isoflavonoid was over 6.45%, and the content of isoflavonoid was 10.50%.

Key words: pueraria lobata chwi; isoflavonoid; extraction; purification

中图分类号: TS202.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2004)08-0124-04

葛根是豆科植物的块根, 在我国资源丰富, 被卫生部批准为“药食两用”植物, 具有降低血管阻力, 降低血压、降血糖、抗氧化作用、改善心脑血管循环、减慢心率和降低心肌耗氧量等药理作用。经现代药理研究发现其有效成分主要是异黄酮类化合物, 如葛根素、大豆黄酮、大豆黄酮甙等。异黄酮类化合物具有降低

心肌耗氧量, 增加冠脉脑血管血流量, 缓解心绞痛, 抗心律失常, 抗氧化, 增强机体免疫力, 生津止渴等多种药理作用。因此对葛根中异黄酮类成分提取、纯化后, 可以更广泛地应用于各类保健食品中^[1]。

本实验对葛根中异黄酮成分的提取和纯化工艺进行了研究, 确定了其最优提取工艺参数和采用氯化钠盐析法的最佳条件, 为进一步的基础研究和应用研究打下了基础。

1 材料与方法

收稿日期: 2003-11-10

作者简介: 杨世军(1975-), 男, 工程师, 大学, 研究方向为天然有机材料。

ment with the Folin phenol reagent[J]. Biol Chem, 1951, 193: 265-275.

[7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 105-106.

[8] Banister J, Fritsch E F, et al. Isolation and characterization

of superoxide dismutase(A). In: Packer L, Board A. eds. Methods in Enzymology[M]. Academic Press Inc, 1984, 105: 88-93.

[9] 黄维华, 袁勤生. SOD的分子结构与性质[J]. 工业生化杂志, 1995, (1): 26-32.