

大麦虫超氧化物歧化酶分离纯化及性质研究

张建新, 刘 娜, 何桂梅, 郭 倩

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:目的: 探讨大麦虫超氧化物歧化酶(SOD)分离纯化条件及其性质, 为大麦虫利用提供科学依据。方法: 以大麦虫为原料, 经盐析沉淀、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤层析等纯化, 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法对蛋白质的组分进行分离并确定其分子质量, 原子吸收光谱仪鉴定酶的类型。结果: 获得了一种酶比活力较高的大麦虫 SOD, 酶的纯化倍数为 68.54 倍, 分子质量为 37.30kD, 属于含铜锌超氧化物歧化酶(Cu,Zn-SOD), 且在 278nm 波长处有紫外吸收峰, 稳定性较好, 最适温度为 40℃, 最适 pH 值为 6.0, 对 H₂O₂、 β -巯基乙醇试剂十分敏感, 受氯仿-乙醇混合液(3:5, V/V)的影响较小。结论: 大麦虫 SOD 具有较高的酶比活力, 稳定性好, 具有较高的利用价值。

关键词: 大麦虫; 超氧化物歧化酶; 分离纯化; 性质

Purification and Characterization of Superoxide Dismutase from *Zophobas morio* L. Larvae

ZHANG Jian-xin, LIU Na, HE Gui-mei, GUO Qian

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Objective: To explore the purification and properties of superoxide dismutase (SOD) from *Zophobas morio* L. larvae. Methods: SOD were obtained from *Zophobas morio* L. larvae by salting-out, DEAE-Sepharose FF column chromatography and Sephadex G-75 column chromatography. SDS-PAGE was used to determine its molecular weight and atomic absorption spectrometer was used to identify its types. Results: SOD with highly specific activity was obtained. The purification factor was 68.54. The purified SOD was identified as Cu, Zn-SOD with molecular weight of 37.30 kD. It had an absorption peak at 278 nm and good stability. Its optimal temperature and pH were 40 °C and 6.0, respectively. Its high sensitivity to H₂O₂ and β -mercaptoethanol was found, while a mixture of CHCl₃ and CH₃CH₂OH (3:5, V/V) had little effect on its activity. Conclusion: The SOD extracted from *Zophobas morio* L. larvae has high enzymatic activity, stability and application potential.

Key words: *Zophobas morio* L.; SOD; purification; characterization

中图分类号: Q969.481.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0215-04

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一类专一的催化超氧阴离子自由基(O₂⁻·)发生歧化反应的金属酶^[1], 按其结合的金属离子不同, 可分为 Fe-SOD、Mn-SOD、Cu,Zn-SOD 类型, 具有抗癌、抗辐射、抗衰老等作用^[2], 在农业、食品与化妆品工业上有广泛的应用价值。大麦虫(*Zophobas morio* L.)俗称超级面包虫, 属于鞘翅目, 拟步甲科昆虫^[3], 与家蝇、黄粉虫幼虫、蟋蟀、蚕蛹、蜡虫幼虫等比较, 大麦虫的蛋白质、氨基酸的含量均居首位, 且大麦虫幼虫体内的 SOD 比活力可达 116.747U/mg^[4], 具有较高的抗氧化、抗衰老价值, 是一种不可多得的优质蛋白源昆虫^[5-7]。目前对洋虫^[8]、黄粉虫^[9-11]、家蚕^[12]、蜂蛹^[13-14]、中华蛭蟥^[15]等昆虫 SOD

的研究较为成熟, 国内外还尚未见有关大麦虫 SOD 性质的研究报道。因此研究大麦虫幼虫中 SOD 的性质, 有助于深入了解大麦虫抗氧化和抗衰老等作用, 为大麦虫的利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大麦虫幼虫购自江苏省南通市周氏生物科技有限公司; 液氮冷冻备用。

SOD 检测试剂盒 南京建成生物工程技术有限公司;
蛋白质标准(D530S) TaKaRa 生物工程有限公司。

Sephadex G-75、DEAE-Sepharose FF、丙烯酰胺、

收稿日期: 2011-06-03

作者简介: 张建新(1959—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品营养安全与标准化。E-mail: zhangjx59@foxmail.com

N,N'-甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、十二烷基硫酸钠(SDS)、*N,N,N',N'*-四甲基乙二胺(TEMED)、Tris、甘氨酸 西安沃尔森生物科技公司;所有试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PK121R 高速冷冻离心机 意大利 ALC 公司;UV-1240 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司;ICE3000 原子吸收光谱仪 美国热电公司;760CRT 型双光束紫外-可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;层析柱(50cm×20mm) 上海雅东玻璃制品有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大麦虫 SOD 的分离纯化

称取 10g 大麦虫幼虫,按固液比 1:35(m/V)的比例加入 pH7.43、0.26mol/L 的磷酸盐溶液匀浆后,静置提取 4h,然后在 65℃ 条件下加热处理 20min,在 8000×g、4℃ 条件下离心 20min 后,在上清液中加入固体(NH₄)₂SO₄ 至 40% 饱和度后于 4℃ 静置过夜,4000×g 离心 100min,上清液继续加入固体(NH₄)₂SO₄ 至 80% 饱和度,于 4℃ 静置 4h 后 4000×g 离心 10min,沉淀用少量 0.05mol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液溶解。然后装入透析袋中对双蒸水透析 72h,用聚乙二醇(PEG)浓缩至 3mL,得到粗酶液。将粗酶液离心,采用 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱 0~1mol/L NaCl 浓度梯度洗脱,分段收集并检测各蛋白峰的 SOD 比活力。合并活力峰,透析除盐,用 PEG 浓缩后的样品经 Sephadex G-75 凝胶过滤层析(平衡体积 300mL,上样量 5mL,流速 0.5mL/min),用 5mmol/L(pH7.8)的磷酸钠缓冲液洗脱,每管收集 4mL,收集酶比活力峰。

1.3.2 大麦虫 SOD 比活力的测定

参照南京建成生物工程技术有限公司 SOD 试剂盒(A001-1)说明书进行测定。

1.3.3 大麦虫 SOD 的酶学特性

1.3.3.1 大麦虫 SOD 的热稳定性

将纯化后的大麦虫 SOD 酶液保持其他条件不变,分别置于 10~90℃ 条件下保温,测定 SOD 比活力,观察温度对大麦虫 SOD 比活力的影响。之后,将纯化后的大麦虫 SOD 分别置于 40、50、60、70℃ 条件下保温 10~180min,测定 SOD 剩余酶活力,观察大麦虫 SOD 的热稳定性。

$$\text{剩余酶活力} / \% = \frac{\text{一定温度下保温一定时间后测定的酶活力}}{\text{保温前酶活力}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3.2 大麦虫 SOD 的酸碱稳定性

将纯化后的大麦虫 SOD 酶液将其 pH 值分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,置于室温条件下 10min,测定 SOD 比活力,观察大麦虫 SOD 的 pH 值稳定性。

1.3.3.3 化学试剂对 SOD 比活力的影响

在酶液中分别加入终浓度为 1mmol/L H₂O₂、5mmol/L H₂O₂、5mmol/L KCN、氯仿-乙醇(3:5, V/V)、0.5% SDS、1.0% SDS 和 0.01% β-巯基乙醇、0.05% β-巯基乙醇、5mol/L 尿素以及含 0.5% 乙二胺四乙酸(EDTA)的 5mol/L 尿素,混合均匀,于室温反应 30min 后,测定溶液的酶比活力,按公式(2)计算化学试剂对 SOD 比活力的抑制率。

$$\text{抑制率} / \% = \frac{\text{原酶力} - \text{剩余酶活力}}{\text{原酶活力}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.4 大麦虫 SOD 分子量测定

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法对蛋白质的组分进行分离,以蛋白标准(D530S)为分子量对照,计算大麦虫 SOD 的分子量。其中 4% 浓缩胶、电压 60V、时间 30min;15% 分离胶、电压 30V、时间 180min。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.3.5 大麦虫 SOD 的光谱性质

用 760CRT 型双光束紫外-可见分光光度计对纯化后 SOD 酶液进行全波长吸收光谱扫描,测定其紫外区的最大吸收波长。

1.3.6 大麦虫 SOD 的金属原子含量鉴定

采用 ICE3000 型原子吸收光谱仪,测定纯化后的大麦虫 SOD 酶液中 Cu、Zn、Mn、Fe 元素的含量^[16]。计算每个酶分子中含有的金属原子的种类及数量,从而确定大麦虫幼虫 SOD 的类型。

1.3.7 蛋白质含量的测定

采用 Bradford 法^[17]测定蛋白质含量。

2 结果与分析

2.1 大麦虫 SOD 的分离纯化

从大麦虫中提取 SOD,经盐析沉淀、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤层析等纯化步骤,获得了比活力及纯度都比较高的 SOD,其结果见表 1。

表 1 大麦虫 SOD 的纯化结果
Table 1 Purification of SOD from *Zophobas morio* L. larvae

纯化步骤	酶液体积 / mL	总蛋白 / mg	酶总活力 / U	酶比活力 / (U/mg)	纯化倍数	回收率 / %
粗酶液	1500	1550.78	159393.11	102.78	1	100
加热处理(65℃、20min)	1278	785.72	130274.43	165.80	1.61	81.73
(NH ₄) ₂ SO ₄	64	282.61	97048.71	343.40	3.34	60.89
DEAE-Sepharose FF	10	28.80	82269.20	2856.57	27.79	51.61
Sephadex G-75	4	3.87	27262.65	7044.61	68.54	17.10

2.2 温度对大麦虫 SOD 比活力的影响

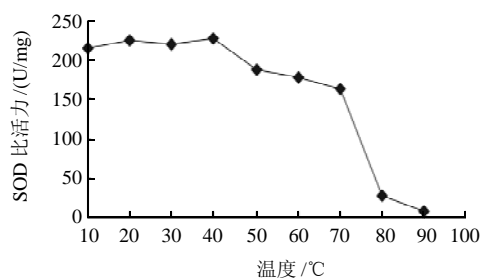


图1 温度对大麦虫 SOD 比活力的影响

Fig.1 Effect of temperature on the activity of SOD

图1表示将酶液在10~90℃条件下保温10min时,温度对大麦虫SOD比活力的影响。在10~60℃,温度对SOD比活力的影响不大,当温度高于70℃时,SOD比活力急剧下降,达到80℃,SOD比活力只有原来的13%;大麦虫幼虫SOD的最适温度为40℃,此时酶比活力为231.2U/mg。

2.3 保温时间对大麦虫 SOD 剩余酶活力的影响

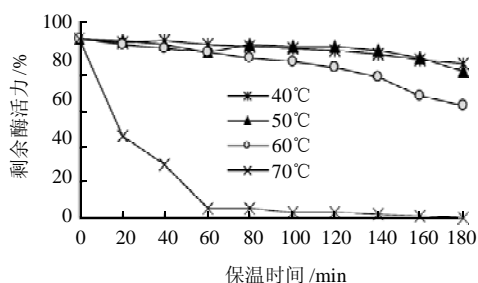


图2 保温时间对大麦虫 SOD 剩余酶活力的影响

Fig.2 Effect of time on the residual activity of SOD

图2表示40~70℃条件下,不同保温时间对大麦虫SOD剩余酶活力的影响,在40、50、60℃条件下保温180min,其SOD剩余酶活力变化趋势无差异,且保温时间对SOD剩余酶活力的影响较小,在70℃条件下,SOD剩余酶活力随时间的延长而急剧下降,在保温60min时,剩余酶活力仅为原有的5.7%。

2.4 pH 值对大麦虫 SOD 比活力的影响

由图3可知。大麦虫SOD比活力在pH6~8之间比较稳定,pH值小于6.0或大于8.0,其酶比活力会急剧下降,这与文献报道的其他来源SOD相似。本实验提取的SOD最适pH值为6.0。

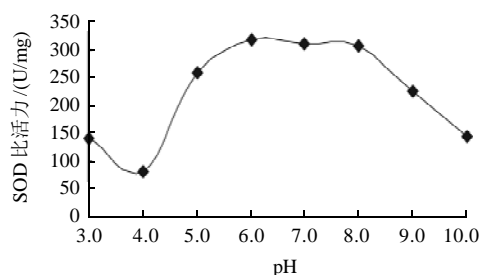


图3 pH 值对大麦虫 SOD 的影响

Fig.3 Effect of pH on the activity of SOD

2.5 化学抑制剂对 SOD 比活力的影响

表2 化学抑制剂对 SOD 比活力的影响

Table 2 Effect of chemical reagents on the activity of SOD

化学抑制剂	原 SOD 比活力 / (U/g)	剩余 SOD 比活力 / (U/g)	抑制率 / %
空白	292.6	292.6	
1mmol/L H ₂ O ₂	292.6	0.1	100.0
5mmol/L H ₂ O ₂	292.6	0.1	100.0
5mmol/L KCN	292.6	0.09	100.0
0.5% SDS	292.6	242.0	17.3
1.0% SDS	292.6	225.2	23.0
0.01% β-巯基乙醇	292.6	286.7	2.0
0.05% β-巯基乙醇	292.6	43.7	85.1
5mol/L 尿素	292.6	280.3	4.2
5mol/L 尿素(含 0.5% EDTA)	292.6	5.6	98.1
氯仿-乙醇(3:5, V/V)	292.6	292.1	0.2

由表2可知,大麦虫SOD对H₂O₂试剂十分敏感,1mmol/L H₂O₂即可使其全部失活;5mmol/L KCN可使酶比活力全部丧失;SDS可使降低SOD比活力,且随SDS含量的增加而明显降低;0.05% β-巯基乙醇可使大麦虫SOD比活力严重丧失;5mol/L 尿素对大麦虫SOD比活力无明显影响,说明低浓度的尿素对酶的分子结构影响不大,但加入含0.5%EDTA的5mol/L 尿素,可使酶比活力完全抑制,可见金属辅基对SOD比活力稳定起重要作用;大麦虫SOD受氯仿-乙醇混合液的影响较小,因此可以判断出大麦虫SOD为Cu,Zn-SOD。

2.6 大麦虫 SOD 分子质量

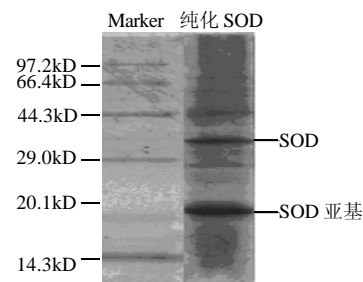


图4 大麦虫 SOD 的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE of purified SOD from Zophobas morio L. larvae

由图4可知,大麦虫中分离纯化的SOD经SDS-PAGE得到两条电泳带,其中一条带子质量为19.18kD,另一条带分子质量为37.30kD;样品缓冲液中2% SDS可使SOD的亚基发生部分解聚而呈现出两条带,说明大麦虫SOD由两个相同的亚基构成。

2.7 大麦虫 SOD 的光谱性质

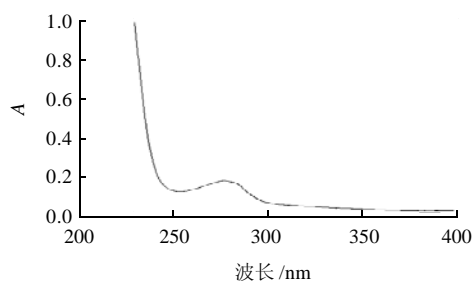


图5 大麦虫SOD的紫外吸收光谱
Fig.5 Ultraviolet absorption spectrum of SOD from *Zophobas morio* L. larvae

本实验使用紫外-可见分光光度计对经Sephadex G-75纯化的大麦虫SOD在200~400nm范围内扫描,结果如图5所示,该酶的紫外吸收峰在278nm。

2.8 大麦虫 SOD 的金属原子含量鉴定

经测定,大麦虫SOD中Cu、Zn、Fe以及Mn的含量分别为Cu 3569.84mg/kg、Zn 3606.86mg/kg、Fe 190.3mg/kg、Mn 3.664mg/kg,计算得出每个大麦虫幼虫SOD分子包含2.08个Cu原子,2.06个Zn原子;而Fe、Mn原子的含量极微。因此可以根据大麦虫SOD分子中含有的金属原子的种类及数量确定大麦虫SOD的类型为Cu,Zn-SOD。

3 结 论

本研究采用DEAE-Sephadex FF阴离子交换柱层析和Sephadex G-75凝胶过滤层析等纯化方法获得了酶比活力较高的大麦虫SOD,其比活力为7044.61U/mg,纯化倍数为68.54倍;经鉴定该酶为Cu,Zn-SOD,其分子质

量为37.30kD,与文献[18]报道的Cu,Zn-SOD的分子量(30~39kD)相当。该酶在278nm波长处有紫外吸收峰,这与文献报道的Cu,Zn-SOD的紫外吸收峰在250~270nm之间稍有差异,可能是大麦虫幼虫SOD含有一定量的酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸所致,因此对大麦虫幼虫SOD的氨基酸种类及含量有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 袁勤生. 超氧化物歧化酶[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2009: 3-6.
- [2] 方允中, 李文杰. 自由基与酶[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 163-164.
- [3] 王仲礼. 从动物血提取SOD[J]. 肉类研究, 2003, 17(1): 42-43.
- [4] 刘娜, 张建新, 何桂梅, 等. 响应面法优化大麦虫SOD提取条件的研究[J]. 西北农业学报, 2011, 20(3): 120-124.
- [5] 梁迪思, 王飞, 郑家概, 等. 北虫草不同部位超氧化物歧化酶(SOD)酶活力的比较[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(2): 183-184.
- [6] 李东旭, 吴蕾, 陈庆森, 等. 双水相体系提取SOD的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(7): 190-192.
- [7] 采克俊, 张丽倩, 刘莉. 大麦虫养殖技术[J]. 现代农业科学, 2008, 15(5): 38-39.
- [8] 董龙. 洋虫超氧化物歧化酶的最佳提取条件[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(4): 69-70.
- [9] 吴蕾, 陈庆森, 刘晋生. 黄粉虫中提取纯化超氧化物歧化酶的工艺研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 281-283.
- [10] 杜开书, 吕文彦, 柴立英. 黄粉虫超氧化物歧化酶的提取及性质研究初报[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(7): 828-830.
- [11] 吉志新, 王长青, 史凤玉, 等. 两种色型黄粉虫杂交后代过氧化物酶同工酶及超氧化物歧化酶比活力的比较[J]. 河北科技师范学院学报, 2008, 22(2): 18-22.
- [12] 唐云明. 家蚕超氧化物歧化酶分离提纯及其基因克隆[D]. 重庆: 西南农业大学, 2001.
- [13] 杜开书, 柴立英, 郎剑锋. 意大利蜜蜂超氧化物歧化酶提取技术研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(23): 6132-6133.
- [14] 张海生, 陈锦屏, 武巧莉, 等. 蜂蛹超氧化物歧化酶(SOD)的提取及理化性质研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 192-195.
- [15] 周艳利, 李建科, 罗生明. 中华蛭蛹超氧化物歧化酶的提取纯化研究[J]. 陕西农业科学, 2007, 54(2): 39-41.
- [16] 李琛. 汉中绿茶中铜、铁、锰、锌、氟含量的测定[J]. 化工技术与开发, 2012, 41(2): 40-42.
- [17] BRADFORD M W. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Ana Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [18] 张兰杰, 候冬岩, 辛广, 等. 鸡红细胞Cu,Zn-SOD的纯化及部分性质研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 266-270.