

# 中压液相色谱纯化牛红细胞超氧化物歧化酶

韩庆宏 汪振珊 徐晓莹 孙琴美 陈福来 张乃忠

(哈尔滨医科大学生化教研室 哈尔滨 150086)

## 1 前言

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase EC 1. 15. 1. 1 SOD)广泛存在于生物体内。它能催化超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)的歧化反应,保护细胞免遭有氧代谢中产生的O<sub>2</sub><sup>-</sup>的毒害,是一种新型的生化酶制剂,具有抗炎、抗衰老<sup>[1]</sup>及抗肿瘤<sup>[2]</sup>等作用,应用于药物治疗<sup>[3]</sup>、日用化妆品<sup>[4]</sup>和食品<sup>[5]</sup>中等,是一种很有前途的生化药物,具有广阔开发前景。本文采用中压液相色谱和梯度洗脱系统,Pharmacia DEAE-Sepharose柱,从牛红细胞分离纯化SOD,较其它方法具有简单、快速,上样量大,产品纯度高,活性高等优点。提取数量可扩大,适宜于制备。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材料和试剂

主要仪器 中压液相色谱系统(LKB产品);色谱柱 DEAE-Sepharose Fast Flow (∅2.5×30cm), G-25(∅2.5×60cm);PE-Lambda 17型紫外可见分光光度计;CS-930双波长扫描仪(日本 Shimadzu);垂直板电泳仪。

主要试剂 DEAE-Sepharose (Pharmacia产品),G-25(Pharmacia产品),SDS(重结晶,浙江黄岩人民化工厂),连苯三酚(AR级,遵义市第二化工厂),其它所有试剂均为分析试剂级。

### 2.2 方法和结果

#### 2.2.1 粗 SOD 提取

参考 McCord 和 Fridorich<sup>[6]</sup>方法,将新鲜牛血离心去血浆。用生理盐水洗涤后加水充分溶血,再加

入0.20倍体积的乙醇和0.15倍氯仿沉淀血红蛋白。离心上清液用丙酮沉淀,离心收集沉淀物,加水溶解除去不溶物及杂蛋白,再用G-25柱脱盐。采用LKB 2212 HELIRAC部分收集器定时收集,收集活性峰,浓缩即得粗SOD溶液。见图1。

#### 2.2.2 第一次 DEAE-Sepharose F F 柱色谱分析

将 DEAE-Sepharose 柱用 1mol/L NaCl 溶液活化后,再用流动相 A(0.0025mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.4)冲洗平衡。50mL 粗 SOD 溶液上样。流动相 B(0.2mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.4)采用图 2 所示梯度洗脱,流速 2.5mL/min。采用 LKB 2212 HELIRAC 部分收集器计时收集 60mL 活性淡蓝色色谱组分,用 G-25 柱脱盐,浓缩液为 34mL,低温保存备用。结果见图 2。

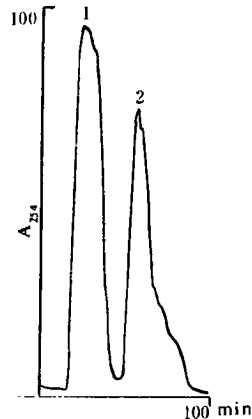


图1 SOD粗品色谱分析图

G-25(∅2.5×60cm)柱,上样50mL,水为流动相,流速3mL/min。峰1为SOD活性峰。

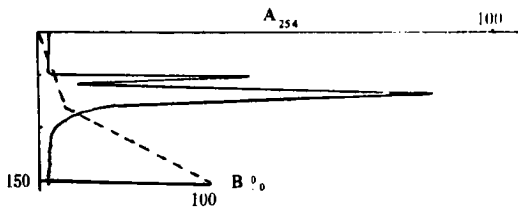


图2 SOD一次DEAE柱色谱分析图

上样50mL,DEAE-Sepharose FF(∅2.5×30cm)柱,UV254nm检测,流动相A、B、B梯度洗脱,流速2.5mL/min。图2峰3和图3峰2为SOD活性峰。

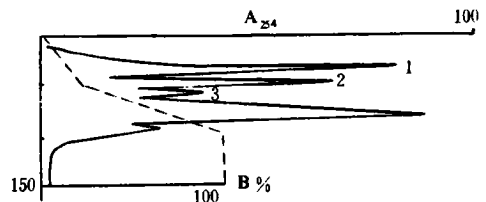


图3 SO二次DEAE柱色谱分析图

表 1 酶提取纯化步骤与各步酶活力回收情况

	U/mL	总体积 (mL)	总活性 (U)	回收率 (%)	冻干粉产品 (U/mg 蛋白)
粗 SOD 产品	$4.56 \times 10^4$	50	$228 \times 10^4$	100	4500
一次产品	$6.08 \times 10^4$	34	$206 \times 10^4$	90.4	9800
二次产品	$7.60 \times 10^4$	22	$166 \times 10^4$	72.8	1,2500

2.2.3 第二次 DEAE-Sepharose F F 柱色谱分析

色谱柱同上处理。将第一次色谱分析收集产品 34mL 上柱,流动相 A 和 B 浓度不变,只是流动相 B 采用图 3 洗脱梯度,流速 2.5mL/min。同上方法收集活性峰体积为 48mL。用 G-25 柱脱盐,再浓缩为 22mL,低温保存或冻干。结果见图 3。

2.2.4 SOD 活性测定及各步酶活力回收情况

结果见表 1。活性采用连苯三酚法<sup>[7]</sup>、蛋白定量采用 Lowry 氏法测定。

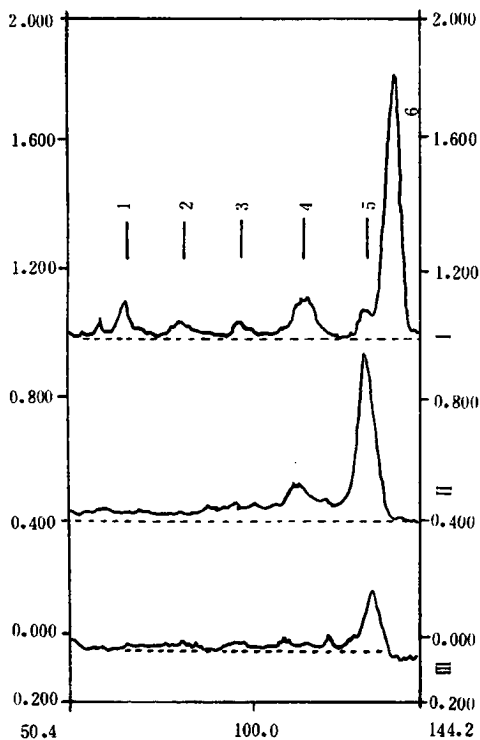


图 4 扫描图谱

1. Phosphorylase (94 000), 2. Albumin (67 000), 3. Actin(43 000), 4. Carbonic Anhydrase(30 000), 5. TMV 外壳蛋白 (17 500), 6. Cty C(11 700)。

2.2.5 SOD-聚丙烯酰胺凝胶电泳

将电泳后凝胶染色后用 CS-930 双波长扫描仪

扫描,见图 4。

2.2.6 紫外吸收光谱分析

将抽提 SOD 精产品稀释,用 PE-Lambda 17 型紫外可见分光光度计扫描其紫外吸收光谱,见图 5。

3 讨论

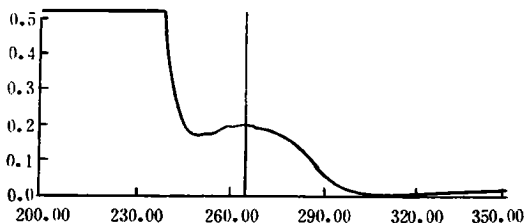


图 5 二次 DEAE 柱色谱分析后 SOD 紫外吸收光谱

本实验采用两次通过 DEAE-Sepharose 柱选择不同洗脱梯度制备牛血红细胞 SOD 产品,无论在其纯度、理化性质和生物活性方面的均达到要求。由于 SOD 粗产品杂蛋白含量大,干扰物质多,加大了纯化难度。本实验为避免杂蛋白污染进行两次柱色谱分析,通过选择流动相 B 浓度而达到纯化的目的。SDS-PAGE 表明:第一次过柱组分 I 中高分子量蛋白还有痕迹,再经过一次过柱后组分 II 则呈现一条带。对这一区带进行测定,其相应分子量在 15 000~17 000 之间,这与文献报道基本一致<sup>[8]</sup>。从紫外吸收光谱来看,在 264nm 处有最大吸收峰。比活在 10 000~15 000U/mg 蛋白之间。本方法用 10L 新鲜牛血可获得 SOD 精产品 300~400 万国际单位,回收率较高,杂蛋白量大大降低。本实验简便,周期短,而且纯度、活性高,适于大量制备。

关键词 中压液相色谱,超氧化物歧化酶,红细胞

参考文献

- 李文杰. 中国药学杂志,1989;24(7): 397
- 魏宽男, 国外医药——合成药、生化药、制剂分册,1991; 12(3): 148
- 陈执中. 中国药学杂志,1989;24(10): 582
- 徐秀兰等. 生化药物杂志,1991;2: 27
- 侯淦泉等. 生化药物杂志,1991;2: 25
- McCord J M *et al.* J Biol Chem,1969;244: 6049
- 谢卫华等. 医药工业,1988;19(5): 217
- 袁勤生等. 生化药物杂志,1991;2: 20

## Purification of Superoxide Dismutase from Bovine Blood by Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)

Han Qinghong, Wang Zhenshan, Xu Xiaoying, Sun Qinmei, Chen Fulai & Zhang Naizhong  
(Laboratory of Biochemistry, Harbin Medical University, 150086)

A rapid and effective purification of superoxide dismutase from bovine erythrocytes by MPLC is reported. After bovine erythrocytes were treated with chloroform-ethanol to remove hemoglobin, acetone was used to remove contaminant proteins. Then highly purified Cu-Zn SOD (the specific activity was 10 000~15 000U/mg pr.) was obtained by twice DEAE-Sepharose chromatography using different eluting procedures. SDS-PAGE of the Cu-Zn SOD purified as above revealed one band. The molecular weight was 15 000~17 000. The maximum ultraviolet absorption was at 264nm.

**Key words** medium pressure liquid chromatography, superoxide dismutase, erythrocyte

书 讯

### 《高效液相色谱法及其专家系统》

由中国科学院大连化学物理研究所-国家色谱研究分析中心卢佩章、张玉奎研究员和梁鑫淼博士共同编著的《高效液相色谱法及其专家系统》一书由辽宁科学技术出版社正式出版。该书是基于大连化学物理研究所这个集体自七十年代初至今对高效液相色谱柱、仪器、色谱方法以及近几年发展的色谱专家系统的研究成果,通过作者系统地总结编写而成的。全书共 48.4 万字,分六章。书价 37 元/本,包装费 2.5 元/本,邮费 5.5 元/本,共 45 元。

### 《实用数据处理》

由国家色谱研究分析中心研究员李浩春编著,青岛海洋大学出版社出版的《实用数据处理》一书定价 4.9 元,另加邮费,共 6 元。

### 《气相色谱法讲义》、《高效液相色谱法讲义》

这两种讲义是国家色谱研究分析中心为培训色谱工作者而编印的教材。《气相色谱法讲义》售价 25 元,邮费另加 5 元。《高效液相色谱法讲义》售价 30 元,邮费另加 5 元。

### 《高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术》

由郭立安编著,陕西科学技术出版社出版的新书《高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术》适合于化学、生物化学、免疫学、分子生物学以及从事蛋白质纯化的研究人员使用。定价 15.5 元,邮费另加 2.5 元。

欲购以上新书者,请从邮局直接汇款至:大连市中山路 161 号(邮编:116012)《色谱》编辑部孙树平收,电话:3631841 转 356。