

无花果叶超氧化物歧化酶的分离、纯化及性质研究

张雷, 曲和之, 黄露, 杜姗姗, 郝东云, 王晓平
(吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130021)

摘要 以我国山东无花果树(*Brunswike*, 原产法国 *Ficus carica*) 树叶为原料, 采用缓冲液抽提、硫酸铵分级、DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析和 Sephacryl S-100 HR 分子筛层析分离纯化得到电泳纯 CuZn-SOD, 并对其酶学性质进行研究.

关键词 无花果树叶; 超氧化物歧化酶; 分离纯化

中图分类号 Q554 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)08-1588-04

1969年, McCord 和 Fridovich^[1] 发现从牛红细胞提取的蓝色含铜蛋白(Hemocuprein)能够催化超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)发生歧化反应, 将其命名为超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, EC 1.15.1.1, 简称SOD). 迄今为止, 所发现的大多数SOD按照其所含金属辅基的不同分为CuZn-SOD, Mn-SOD和Fe-SOD等三类. 3种SOD催化同样的反应, 但是性质有所不同. SOD是一类广泛存在于生物体内的金属酶类, 专一清除体内 $O_2^{\cdot-}$, 消除活性氧(ROS)毒性, 保护机体不受 $O_2^{\cdot-}$ 攻击^[2]. 研究表明, 植物SOD在抗衰老、预防和治疗心脑血管等疾病方面具有明显效果. 本文报道了以山东的无花果树叶为原料, 通过抽提、硫酸铵分级、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析和 Sephacryl S-100 分子筛层析分离纯化, 得到超氧化物歧化酶, 对其理化性质进行研究. 结果表明, 无花果叶SOD为CuZn-SOD, 亚基表观分子量17800, 在碱性条件下稳定, 热稳定性高, 具有对高浓度尿素和SDS抗性, H_2O_2 可以完全抑制其活性.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

新鲜无花果树(*Brunswike*, 原产法国 *Ficus carica*) 树叶采自山东省.

DEAE-Sepharose Fast Flow、Sephacryl S-100 (High Resolution) 及低分子量标准蛋白 Marker 购自 Amersham 公司; 邻苯三酚、溴酚蓝、十二烷基磺酸钠(SDS)和 *N,N,N',N'*-四甲基乙二胺(TEMED) 购自上海生物工程有限公司; 三羟基氨基甲烷(Tris)、考马斯亮蓝、过硫酸铵(AP)、丙烯酰胺(Acr)、*N,N'*-甲叉双丙烯酰胺(Bis)、硝基氮蓝四唑(NBT)和甘氨酸购自北京鼎国生物科技有限公司; 人血清白蛋白和 Folin 乙试剂由长春生物制品所提供. 其它试剂均为国产分析纯.

DYC-242 垂直板电泳槽(北京六一公司), CRG 高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司), FT-750 荧光分光光度计(Jasco), J-810 圆二色谱仪(Jasco), UV-1700 紫外分光光度计及 UV-2550 紫外分光光度计(Shimadzu).

1.2 实验过程

1.2.1 粗酶的提取 将无花果树叶以预冷蒸馏水洗涤除去表面杂质, 加入 0.05 mol/L pH = 7.8 的磷酸钠缓冲液(含 1×10^{-4} mol/L EDTA, 质量分数为 0.01% 的 β -巯基乙醇和 0.1% 的甘油)匀浆、抽提, 除渣过滤后, 收集上清液, 即为粗酶液.

1.2.2 无花果叶 SOD 的纯化 向粗酶液中加入固体硫酸铵至 40% 饱和度, 于 4 °C 静置 1 h, 以 10000 r/min 的速度离心 15 min. 收集上清液, 补加固体硫酸铵至 85% 饱和度, 于 4 °C 静置后离心. 沉淀用

5 mmol/L, pH = 7.8 的磷酸钠缓冲液溶解, 并对其透析. 次日离心, 取上清液经 DEAE-Sepharose FF (1 × 20 cm) 阴离子交换柱(用 5 mmol/L pH = 7.8 的磷酸钠缓冲液平衡), NaCl 浓度梯度洗脱, 分段收集并检测各蛋白峰的酶活. 合并活力峰, 透析除盐, 冻干浓缩后的样品经 Sephacryl S-100 HR (1 × 100 cm) 凝胶过滤层析, 用 5 mmol/L pH = 7.8 的磷酸钠缓冲液洗脱, 收集活性峰.

1.2.3 无花果叶 SOD 活性测定 参考文献[3]方法, 采用邻苯三酚自氧化法测定 SOD 的酶活性. 按文献[4]方法测定蛋白质含量, 以人血清白蛋白为标准蛋白.

1.2.4 无花果叶 SOD 的纯度鉴定、活性染色和酶类型鉴定 用质量分数为 10% 的 PAGE^[5] 检定其纯度, 参照 Beauchamp 等^[6] 的方法进行 NBT 活性染色, 根据 SOD 对抑制剂的敏感性, 确定无花果叶 SOD 酶的类型^[7].

1.2.5 酶分子量的测定 采用质量分数为 5% 的浓缩胶和 15% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝 R-250 染色, 以 Amersham 公司的低分子量标准蛋白为分子量对照, 考察并计算无花果叶 SOD 的分子量.

1.2.6 无花果叶 SOD 的酸碱稳定性 在酶液中分别加入 pH = 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 和 12.0 的缓冲液, 混合均匀, 于 4 °C 放置 24 h, 于 25 °C 依次测定酶活性.

1.2.7 温度对无花果叶 SOD 活性的影响 将酶液分别于 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 和 100 °C 水浴中保温 15 min 后测定酶活性.

1.2.8 无花果叶 SOD 的热稳定性测定 将酶液分别在 50 和 60 °C 水浴中保温 30, 60, 90, 120, 150 和 180 min; 在 70 °C 水浴中保温 1, 5, 10, 15, 20 和 30 min 后测定酶活性.

1.2.9 金属辅基的去除和替换试验 将酶液用 0.05 mol/L pH = 3.8 的乙酸钠缓冲液(含 1 mmol/L EDTA) 透析 24 h 后, 改用 5 mmol/L pH = 7.8 的磷酸钠缓冲液透析. 取脱金属辅基的 SOD 溶液, 分别加入终浓度为 1 mmol/L 的各种金属离子, 混合均匀, 用 25 °C 水浴保温 2 h, 测定 SOD 活性.

1.2.10 化学试剂对酶活性的影响^[8] 在酶液中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的 NaN_3 , 5 mmol/L 的 H_2O_2 , 氯仿/乙醇(体积比 2:3)、质量分数为 0.5% 的 SDS 和 0.01% 的 β -巯基乙醇以及 5 mol/L 尿素, 混合均匀, 于室温反应 30 min 后测定溶液的酶活性.

2 结果与讨论

2.1 酶的分离纯化

从无花果叶中抽提分离 SOD, 经硫酸铵分级、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析和 Sephacryl S-100 分子筛层析等步骤提纯, 获得较高比活的酶(4220 U/mg).

2.2 无花果叶 SOD 的纯度鉴定、活性染色和酶类型鉴定

无花果叶 SOD 经 PAGE 电泳、凝胶并以考马斯亮蓝染色结果如图 1(A) 谱带 1 所示, 可见呈现单一条带. 将 SOD 经 PAGE 的凝胶, 按泳道切割成条, 分别用磷酸缓冲液、 H_2O_2 、氯仿-乙醇浸泡处理

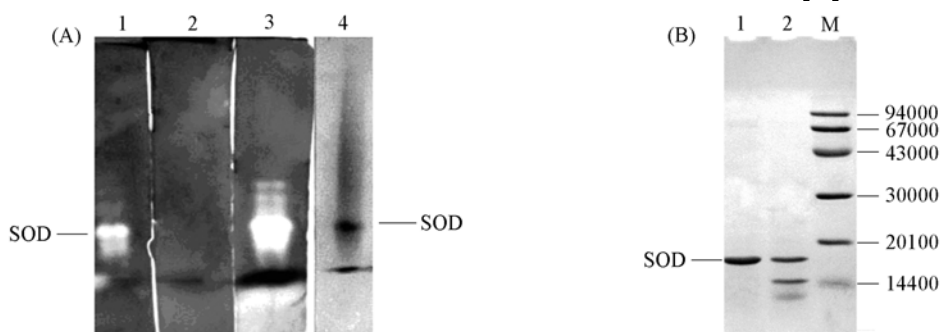


Fig. 1 Purified SOD from *Ficus carica* leaves

(A) Type identification and activity staining by NBT of SOD after native-PAGE. Lane 1. purified SOD sample; lane 2. treated by 5 mmol/L H_2O_2 ; lane 3. treated by chloroform-ethanol; lane 4. stained with coomassie brilliant blue R250. (B) SDS-PAGE of SOD. Lane 1. purified SOD sample; lane 2. lyophilized sample eluted from DEAE-Sepharose Fast Flow column; M. low molecular weight standard protein marker.

后,进行 NBT 活性染色,结果如图 1(A) 谱带 2~4 所示,可见经磷酸缓冲液、氯仿/乙醇处理的胶条,在相应位置可见特有的活性条带,而用 H_2O_2 处理的胶条未呈现活性染色条带. 在已发现的 3 种 SOD 中,只有 CuZn-SOD 对 H_2O_2 敏感. 实验结果表明,所获得的无花果叶 SOD 为 CuZn-SOD.

2.3 无花果叶 SOD 分子量的测定

无花果叶 SOD 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 1(B) 所示. 以低分子量标准蛋白的相对迁移率和分子量对数作标准曲线,经计算测得 SOD 的亚基表观分子量为 17800.

2.4 无花果叶 SOD 的酸碱稳定性

无花果叶 SOD 的酸碱稳定性实验结果如图 2(A) 所示. 可见无花果叶 SOD 在碱性条件下比较稳定,在酸性条件下没有活性.

2.5 温度对无花果叶 SOD 活性的影响

温度对无花果叶 SOD 活性的影响如图 2(B) 所示. 可见无花果叶 SOD 的最适宜反应温度为 30 $^{\circ}C$. 当温度接近 70 $^{\circ}C$ 时,酶活损失较大.

2.6 无花果叶 SOD 的热稳定性测定

无花果叶 SOD 的热稳定性实验结果如图 2(C) 所示. 可见将酶在 60 $^{\circ}C$ 保温 1 h, 酶活保持 90% 以上,在 70 $^{\circ}C$ 左右酶活力下降较快.

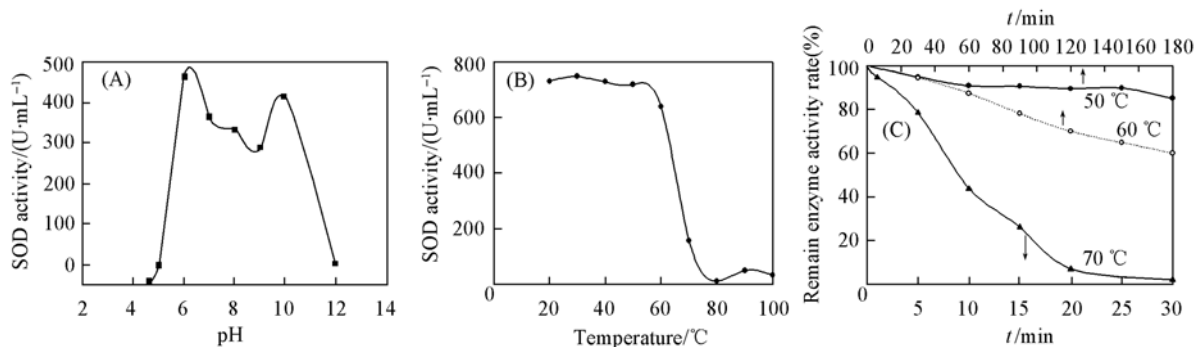


Fig. 2 Properties of purified SOD from *Ficus carica* leaves

(A) Stability to pH of SOD; (B) optimum temperature of SOD; (C) stability to temperature of SOD.

2.7 金属辅基的去除和替换试验

金属辅基的去除和替换试验结果列于表 1. 从表 1 可以看出, Cu^{2+} , $Cu^{2+} + Zn^{2+}$, Fe^{2+} , Mn^{2+} 均可使脱金属辅基 SOD 的活性有所恢复. 其中 Cu^{2+} 与 Zn^{2+} 共同作用时,可使脱金属辅基酶的活性恢复 60% 以上;单独的 Cu^{2+} 可使酶活性恢复 30%,而单独的 Zn^{2+} 不能使酶活性恢复. 该结果表明, Cu^{2+} 与 Zn^{2+} 的作用不同: Cu^{2+} 参与催化反应,而 Zn^{2+} 则稳定酶结构.

Table 1 Restoration of metal ions to the activity of apoenzyme of SOD from *Ficus carica* leaves

Metal ions	Activity of enzyme/ (U · mL ⁻¹)	Restoration ratio of activity of enzyme (%)	Metal ions	Activity of enzyme/ (U · mL ⁻¹)	Restoration ratio of activity of enzyme (%)
Initial enzyme sample	46	—	Fe^{2+}	6	12.5
Apoenzyme of SOD	6	—	Mn^{2+}	9	19.0
Cu^{2+}	15	31.0	Hg^{2+}	0	0
Zn^{2+}	0	0	Pb^{2+}	0	0
$Cu^{2+} + Zn^{2+}$	30	65.6	Fe^{3+}	0	0

2.8 化学试剂对酶活性的影响

变性剂和还原剂对酶活性的影响结果表明,只有 5 mmol/L H_2O_2 完全抑制 SOD 的活性,而其它几种化学试剂对 SOD 活性影响不明显(结果未展示),表明无花果叶 SOD 稳定性较好,对于 SDS 和尿素都有一定的抗性. 而由于 H_2O_2 能与 Cu^{2+} 反应,使 Cu^{2+} 变成 Cu^+ ,导致酶失活,所以 H_2O_2 可以完全抑制 SOD 的活性.

从无花果叶中分离提纯一种 CuZn-SOD,并对其理化性质进行了表征. 实验结果表明,该酶热稳定性高,在碱性条件下稳定,具有对高浓度尿素和 SDS 抗性, H_2O_2 可以完全抑制其活性. 以上研究结果

为无花果 SOD 的应用提供了理论依据, 也为无花果的深加工和综合利用提供了信息.

参 考 文 献

- [1] McCord J. M. , Fridovich I. . Journal of Biological Chemistry[J], 1969, **244**: 6049—6055
- [2] FANG Yun-Zhong(方允中), LI Wen-Jie(李文杰). Free Radical and Enzyme(自由基与酶)[M], Beijing: Science Press, 1989: 9—10
- [3] DENG Bi-Yu(邓碧玉), YUAN Qin-Sheng(袁勤生), LI Wen-Jie(李文杰). Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理学进展)[J], 1991, **18**(2): 163—165
- [4] Lowry O. H. , Rosebrough N. J. , Farr A. L. , *et al.* . Journal of Biological Chemistry[J], 1951, **193**: 265—275
- [5] Sambrook J. , Russell D. W. . Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (分子克隆实验指南, 第3版)[M], Beijing: Science Press, 2002: 1716—1720
- [6] Beauchamp C. , Fridovich I. . Anal. Biochem. [J], 1971, **44**: 276—287
- [7] CHENG Guang-Yu(程光宇), WEI Jin-Cheng(魏锦城), WU Guo-Rong(吴国荣), *et al.* . Acta Phytophysiologica Sinica(植物生理学报)[J], 1994, **4**: 248—250
- [8] Baum J. A. , Scandalios J. G. . Archives of Biochemistry and Biophysics[J], 1981, **206**: 249—264

Separation, Purification and Properties of Superoxide Dismutase from *Ficus carica* Leaves

ZHANG Lei, QU He-Zhi, HUANG Lu, DU Shan-Shan, HAO Dong-Yun, WANG Xiao-Ping*

(Key Laboratory for Molecular Enzymology & Engineering, Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract A CuZn-SOD from *Ficus carica* leaves was separated and purified with ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sepharose fast flow chromatography and Sephacryl S-100 HR chromatography techniques. One major bright band was achieved on polyacrylamide gel electrophoresis stained with nitroblue tetrazolium (NBT). The molecular weight of the enzyme subunit was determined by SDS-PAGE to be about 17800. We investigated the physical and chemical properties of the enzyme, and characterized its kinetic properties, such as the optimal pH, optimal temperature and the effect of chemical reagents and metal ions on the SOD. The results show that the stability of this purified SOD appeared to be better than other SODs reported. The analysis results of circular dichroism spectrum reveals that the enzyme possessed approximate 12.78% of α -helix in its secondary structure.

Keywords *Ficus carica* leaves; Superoxide dismutase; Separation and purification

(Ed. : H, J, Z)