意大利蜜蜂蛹超氧化物歧化酶提取技术研究

杜开书,柴立英,郎剑锋 (河南科技学院植物保护系,河南新乡 453003)

摘要　以意大利蜜蜂蛹冻干粉为研究材料,经提取、盐析、浓缩、透析和DEAE纤维素离子交换柱层析等纯化步骤,获得了一种超氧化物歧化酶(SOD)。该酶蛋白结晶呈菱形,PAGE法显示为均一的蛋白谱带。在相同时间内,测定了pH值、温度对该酶活力的影响。结果表明:意大利蜜蜂蛹中SOD在pH值为8.3时,酶活力最高,pH值高于或低于8.3时,酶活力均有明显下降;温度在25 ℃左右时,该酶活力最高,40 ℃时保持活力在80%以上,到90 ℃时没有活力,说明意大利蜜蜂蛹SOD是一种比较耐热的酶,这为SOD的提取提供了新酶源。

关键词　意大利蜜蜂蛹;超氧化物歧化酶(SOD);提取
中图分类号　Q55　　文献标识码　A　　文章编号　0517-6611(2006)23-6132-02

Preliminary Report on the Extraction Technique of Superoxid Dismutase from the Pupae of *Apis mellifer*

DU Kai-shu et al (Plant Protection Department, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract　In the paper, the freeze-drying pupae of Apis mellifer was used as experimental material based on former studies. The purified superoxide dismutase(SOD) was obtained through the extraction, pricipitation, condensation, dialysis and DEAE-cellulose cloumn chromatography and so on. The superoxide dismutase was rhombus crystal and the PAGE electropherogram showed that it was a homogeneous protein. The result of the influence of enzyme at the different pH and temperature in the same time respectively showed the superoxide dismutase kept the most activity at pH 8.3 and the activity came down above or below pH 8.3. It kept the most activity at the 25 ℃ and it could remain 80% enzyme activity at the 40 ℃, but it losted the activity in the 90 ℃. So the SOD was a more heat-resistant enzyme. It can afford a new enzyme source of superoxide dismutase extraction.

Key words　Pupae of Apis mellifer; Superoxid dismtase; Extraction

超氧化物歧化酶(superoxid dismutase,SOD)是一种以自由基O_2^-为底物的金属酶[1],在生物体内广泛分布。它催化自由基O_2^-与H^+反应生成H_2O_2和O_2,H_2O_2在过氧化氢酶、过氧化物酶和谷胱甘肽过氧化物酶等作用下转变为H_2O,在机体内形成一套解毒系统,从而对机体起防护作用。因此,SOD具有抗辐射、抗衰老、防癌等延长人体寿命的功能。意大利蜜蜂在我国是一种比较常见的蜜蜂,来源丰富。笔者以意大利蜜蜂蛹粉为材料,经提取及一系列纯化步骤,获得菱形结晶的SOD。

1　材料与方法

试验于2005年7月10日在河南科技学院生物化学实验室进行。

1.1　材料　意大利蜜蜂蛹冻干粉,由河南科技学院蜜蜂厂提供;DEAE-Sepharose为pharmacia产品;电泳仪为河南科技学院生化教研室生产。其余试剂均为市售生化试剂或分析试剂。

1.2　SOD的提取与纯化[2]　取2 g意大利蜜蜂蛹冻干粉,用0.05 mol/L、pH值7.8的磷酸钾缓冲液研磨,定容100 ml,4 ℃下10 000 r/min离心15 min,收集上清液,加入固体$(NH_4)_2SO_4$至25%饱和度。再离心,收集上清液,加入固体$(NH_4)_2SO_4$至75%饱和度,在冰箱中静置4 h,离心收集沉淀,沉淀溶于一定量上述缓冲液,在冰箱中静置过夜。离心,弃去沉淀,上清液对上述缓冲液透析过夜。透析液经聚乙二醇浓缩,取浓缩液6.5 ml(蛋白质含量8.98 mg/ml,酶活力827 U/ml),然后用DEAE-Sepharose和0.05～0.5 mol/L、pH值7.8的缓冲液离子强度线性梯度洗脱,每管收集5 ml,9 min流完。洗脱液出现2个蛋白峰,其中第1个峰为酶的活性峰,收集酶活性峰洗脱液共102 ml(蛋白质含量为0.89 mg/ml,酶活力为92.3 U/ml),浓缩至5.6 ml(蛋白质含量为0.05 mg/ml,酶活力为195.7 U/ml),置冰箱中,显微镜下观察结晶形成,经7 d左右出现菱形结晶。

1.3　酶活力的测定　采用改良的邻苯三酚自氧化法[3]。邻苯三酚自氧化速率控制在0.070 A/min。活力定义:1 ml反应液中,1 min抑制邻苯三酚自氧化速率达到50%的酶量规定为1个活力单位(U)。

1.4　PAGE和SDS-PAGE　酶的纯度分析参考文献[2],分离胶7.5%(pH值8.9),浓缩胶2.5%(pH值6.8)。样品上样量每孔1.5 μl,恒压160 V,电泳完毕后,用固定液10%三氯乙酸固定2 h,再用考马斯亮蓝R-250染色2 h,用脱色液(冰醋酸∶乙醇∶H_2O=75∶50∶87.5,体积比)洗至背景无色。扫描保存试验结果。

酶相对分子质量测定采用SDS-PAGE,分离胶10%(pH值8.9),浓缩胶3.75%(pH值6.8)。将样品App处理后上样,每孔15 μl,电压160 V,电泳2 h。电泳完毕后,用10%三氯乙酸固定2 h,再用考马斯亮蓝R-250染色2 h,然后用脱色液(冰醋酸∶乙醇∶H_2O=75∶50∶87.5,体积比)洗至背景无色。扫描保存试验结果。

2　结果与分析

2.1　酶的提取及纯化　意大利蜜蜂蛹经硫酸铵盐析,DEAE-Sepharose和分子筛Sephacryl S-200,得到了电泳单一区带的酶制剂。酶的DEAE-Sepharose洗脱图谱见图1。在分离纯化各步骤中酶活力、纯化倍数以及回收率见表1。然后计算出酶的

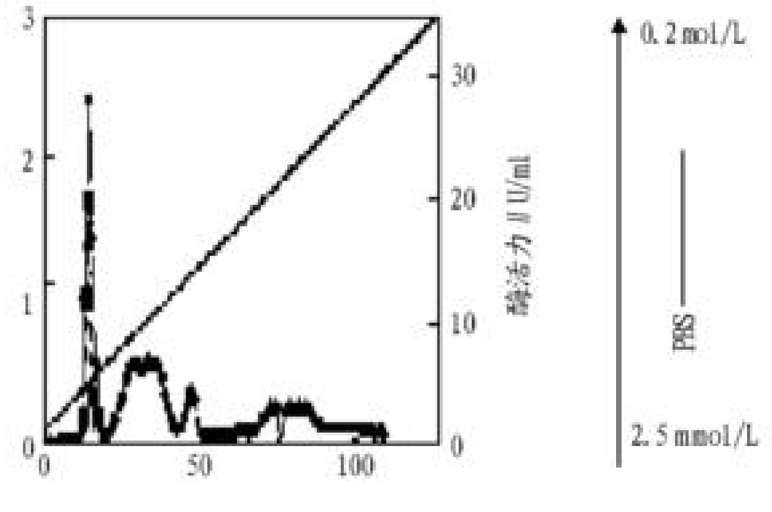


图1　DEAE-Sepharose对SOD提取的洗脱图谱

作者简介　杜开书(1976-),女,四川泸县人,在读硕士,讲师,从事昆虫教学和害虫综合治理研究。

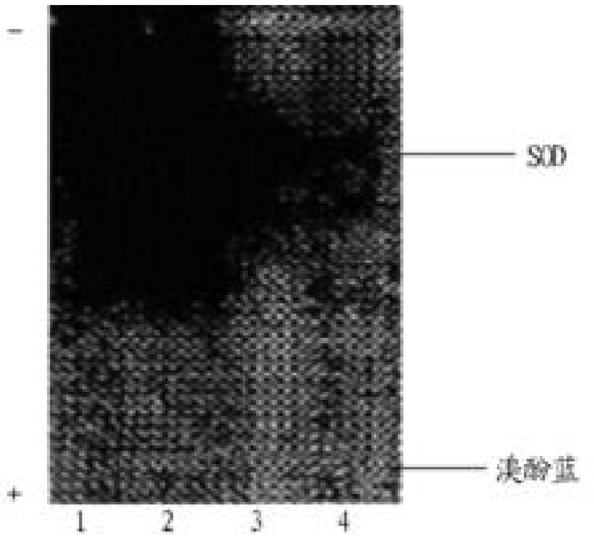
收稿日期　2006-09-05

比活力为53.05，纯化倍数和回收率分别为104.0 和2.98%。最后计算出，意大利蜜蜂蛹中SOD 的含量为0.05 mg/g。

表1　不同溶液对意大利蜜蜂蛹SOD 的纯化

纯化步骤	体积 ml	总蛋白 mg	总活力 U	比活力 U/mg	纯化倍数	回收率 %
匀浆液	76	4 321.57	2 204	0.51	1	100
$(NH_4)_2SO_4$ 析出液	26	265.34	307.8	1.16	2.27	13.97
DEAE-sepharose 洗液	9	20.38	138.78	6.81	13.35	6.30

2.2　酶的纯度分析　将纯化得到的酶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，考马斯亮蓝R-250 染色，得到1 条蛋白区带，表明该酶制剂已达到电泳纯(图2)。



注:1 为匀浆液;2 为盐析出液;3 为凝胶电泳洗脱液;4 为分子筛洗脱液。

图2　考马斯亮蓝蛋白谱带

2.3　酶的最适pH 值　在此次试验条件下，SOD 的活性随pH 值的变化结果见图3。由图3 可见，酶的最适pH 值为8.3，pH 值高于或低于8.3，酶活力均有明显下降，pH 值在8.0 以下和8.5 以上，酶活力为零。说明pH 值对酶活力的影响很大。

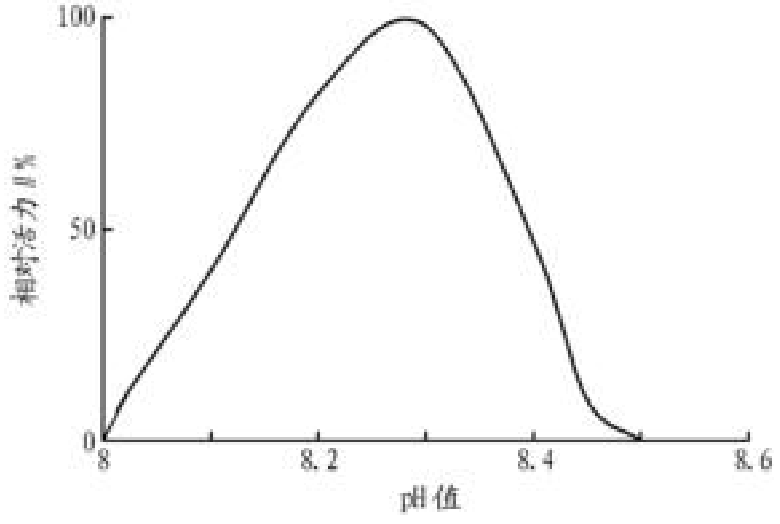


图3　pH 值对SOD 活力的影响

2.4　温度对酶活力的影响　温度对酶活力的影响见图4。SOD 是一种耐热性比较高的酶，在40 ℃保温15 min，酶活力保持80%以上，在55 ℃保温15 min 后，酶活力保持60%以上，而在70 ℃保持15 min 后，酶活力只能保持20%。在90 ℃保温15 min 后，基本没有活力。这与顾洪雁等研究基本一致[4]。

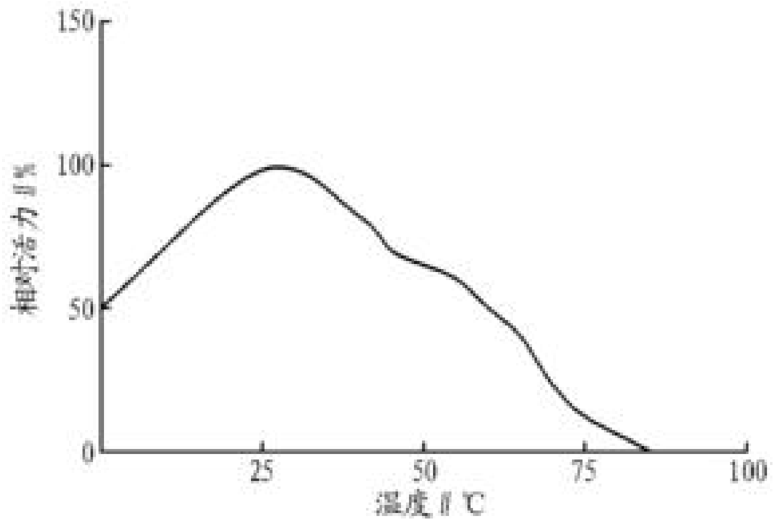


图4　温度对SOD 活力的影响

3　讨论

自从Mccord 和Fridovich 首先从牛的红细胞中提取到SOD 以来，迄今为止人们已经从细菌、真菌、原生动物、藻类、昆虫、鱼类、植物和哺乳动物等各种生物体内分离得到了SOD。家蚕血淋巴中也存在着SOD[5]，意大利蜂王浆中含有大量的SOD[6]。但意大利蜜蜂蛹中SOD 的情况尚未见报道。笔者以意大利蜜蜂蛹粉为原料，经$(NH_4)_2SO_4$ 分步沉淀、浓缩、脱盐、离子交换柱层析等步骤，分离纯化得到一种SOD。该酶酶活力为1 250 U/ml，比活力为53.05 U/ml，纯化倍数和回收率分别为104.0 和2.98%，活力回收率达87%，并得到了呈菱型的结晶。结晶酶液经SDS-PAGE 垂直板电泳，考马斯亮蓝R-250 染色检测，结果仅出现1 条谱带，说明这种SOD 已得到纯化。这种意大利蜜蜂蛹SOD 分离纯化技术具有简便易行、分辨率高等优点，为酶的分离纯化提供了借鉴。对分离到的酶的热稳定性分析表明，酶在55 ℃下保温15 min 有62%的酶活力，在70 ℃下保温15 min 后仍有20%的酶活力。说明该实验中分离到的SOD 与大多数SOD 一样对热比较稳定。不同pH 值对SOD 的影响也不一样，pH 值在8.3 时保持活力的时间最长，即在弱碱的环境中提取出来的SOD 效果较好。另外，意大利蜜蜂的来源十分广泛，且生长周期短，因而可作为SOD 的新酶源。

参考文献

[1]　赵保和. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 133.
[2]　施茵. 超氧化物歧化酶的分离提取[J]. 生物技术, 2002, 12(1): 21-22.
[3]　邓碧玉. 改良的连苯三酚自氧化法测定超氧化物酶活性的测定方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991(18): 163.
[4]　顾洪雁, 袁均林. 温度对猪血提取超氧化物歧化酶的影响[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2002, 36(3): 358-360.
[5]　纪平雄, 徐凤彩. 利用柞蚕蛹粉提取超氧化物歧化酶[J]. 蚕业科学, 2001, 27(1): 332-334.
[6]　闵丽娥, 李佳. 意蜂蜂王浆超氧化物歧化酶的分离纯化及部分性质[J]. 昆虫学报, 2004, 47(2): 171-177.