

越橘叶超氧化物歧化酶的分离纯化与定性研究

贺 阳, 文连奎*, 路 鑫, 蒋海芹, 李倩倩

(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

摘 要: 采用超声波辅助提取越橘叶超氧化物歧化酶得粗酶液, 经选择性热变性、Sephadex G-75 柱层析、透析、冷冻干燥, 得到纯度较高的越橘叶超氧化物歧化酶。聚丙烯酰胺凝胶电泳显示在 32kD 和 42kD 左右有 2 条清晰条带; 紫外-可见光谱扫描在波长 258nm 和 280nm 处有吸收峰; 原子吸收光谱也测定出越橘叶超氧化物歧化酶中含有铁、锰、锌离子。结果表明越橘叶超氧化物歧化酶有 3 种类型: Fe-SOD、Mn-SOD 和 Cu/Zn-SOD。

关键词: 越橘叶; 超氧化物歧化酶; 分离纯化; 性质鉴定

Purification and Characterization of Superoxide Dismutase from Blueberry Leaves

HE Yang, WEN Lian-kui*, LU Xin, JIANG Hai-qin, LI Qian-qian

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Superoxide dismutase (SOD) was extracted from blueberry leaves with phosphate buffered saline (PBS), and then purified sequentially by selective thermal denaturation, dialysis, and Sephadex G-75 column chromatography. Purified protein with high SOD activity was finally lyophilized. The SDS-PAGE of purified protein showed two bands at 32 kD and 42 kD, respectively. UV scanning showed that the enzyme had two absorption peaks at 258 nm and 280 nm, respectively. Atomic absorption indicated that the enzyme contained Zn, Mn, and Fe. In summary, blueberry leaves contain three different types of SOD: Fe-SOD, Mn-SOD, and Cu/Zn-SOD.

Key words: blueberry leaves; superoxide dismutase; purification; characterization

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0206-04

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一类具有清除氧自由基、抗炎、抗辐射、抗衰老的金属蛋白酶^[1-2]。目前市场上的 SOD 产品主要是以动物类材料提取加工而成。SOD 的纯化工艺大多采用有机溶剂法、多种层析联用法^[3-6], 这些方法对产品质量不但有影响且操作繁琐, 成本高。

越橘是一种天然植物资源, 我国越橘资源丰富^[7], 越橘叶中含有超氧化物歧化酶、熊果酚苷、乌苏酸(三萜成分)、鞣质等, 有利尿、消炎、防腐之功效^[8-9]。目前国内外尚未见从越橘叶中分离纯化 SOD 的相关报道。本实验以越橘叶为原料, 采用超声波法提取 SOD 粗酶液, 并优化分离纯化方法, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳、紫外-可见光谱扫描、原子吸收光谱法对提取的越橘叶 SOD 进行定性研究, 为 SOD 新资源的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

越橘叶, 采自吉林农业大学越橘园, 品种为美登, 采摘时间 8 月下旬。

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙二胺四乙酸、邻苯三酚、二乙基三胺基五乙酸、考马斯亮蓝 G-250、乙醇、磷酸、硫酸铜、硫酸钾、高锰酸钾、氯化锌、硫酸亚铁(均为分析纯) 天津市科密欧化学试剂有限公司; 三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白(生化试剂) 中国惠世生化试剂有限公司; 透析袋(进口分装) 北京鼎国生物技术有限责任公司; Sephadex G-75(进口分装) 上海锐聪实验室设备有限公司。

1.2 仪器与设备

GL-21LM 高速冷冻离心机 湖南星科科学仪器有限公司; JYL-610 组织捣碎机 九阳股份有限公司; JY92-II 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司; T6 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; DSY-2 电热恒温水浴锅 北京国华医疗器械厂; DYY-11 电泳仪 北京市六一仪器厂; HD-2000 核酸蛋白

收稿日期: 2011-07-01

作者简介: 贺阳(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为长白山野生资源的开发与利用。E-mail: heyang200704@126.com

*通信作者: 文连奎(1962—), 男, 教授, 博士, 研究方向为长白山野生资源的开发与利用。E-mail: wenliankui@163.com

检测仪、BSZ-100 自动部分收集器、HL-2B 数显恒流泵 上海嘉鹏科技有限公司; TA5-990 原子吸收分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; KDN-04 消化炉 上海精隆科学仪器有限公司; LGJ-12 冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

适时采摘的品种为越橘叶, 经筛选、清洗、低温干燥、称取、切碎后, 加入 pH7.8、0.05mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS), 组织捣碎至匀浆状态。在 -40℃ 条件下冻融 2~3 次。在超声功率 780W、超声时间 5.8min、液料比 2.4:1 的冰浴条件下进行超声波破碎提取^[10]。4℃、10000r/min 离心 10min, 得到 SOD 粗酶液, 测定粗酶液酶活力。

1.3.2 越橘叶 SOD 粗酶液的选择性热变性纯化

SOD 的热变性失活温度在 65~70℃ 以上, 而大部分杂蛋白在 50~55℃ 时就变性^[11-12]。利用 SOD 与杂蛋白的变性温度差异, 进行选择热变性处理, 以酶比活力为评价指标确定热变性参数。

在时间为 15min 条件下, 分别选择热变温度为 55、65、75℃ 对越橘叶 SOD 进行热变处理。在温度为 65℃ 条件下, 分别选择热变时间为 5、15、25min 对粗酶液进行热变处理。

越橘叶 SOD 进行选择热变性后, 于 4℃、10000r/min 离心 10min。上清液在 4℃ 条件下透析浓缩。

1.3.3 Sephadex G-75 柱层析分离纯化 SOD

称取葡聚糖凝胶, 加入约 20 倍凝胶体积的水, 煮沸溶胀 1~2h。装柱时, 柱的底部用装有细玻璃管的橡皮塞塞紧, 用洗净的约 200 目尼龙布垫底。然后将柱垂直安装好, 接着将溶胀好的凝胶边搅匀边缓缓连续装入, 凝胶颗粒沉积到柱底后关紧色谱柱。用去离子蒸馏水洗脱剂洗脱过夜。Sephadex G-75 平衡后, 将 1.3.2 节处理后的酶液缓慢加入色谱柱, 上样体积为 3mL。用 pH7.8、0.05mol/L 磷酸盐缓冲液进行洗脱, 控制流速在 0.2mL/min, 用核酸蛋白仪检测, 每管收集 3mL。洗脱后测定每管酶活力, 收集酶活性较高的洗脱峰, 透析浓缩。浓缩液进行 2 次 Sephadex G-75 柱层析, 用 0.05mol/L(pH7.8) PBS 洗脱, 流速 0.2mL/min, 洗脱液的收集与处理同第 1 次柱层析。得到的浓缩液于 -50℃ 条件下真空冷冻干燥, 得粉末状 SOD。

1.3.4 酶活力测定

采用邻苯三酚自氧化法^[13-14]。在 1mL 反应液中, 每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 时所需的酶量为一个酶活力单位。

1.3.5 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量

将考马斯亮蓝 G-250 100mg 溶于 50mL 95% 乙醇, 加入 100mL 85% H₃PO₄, 用蒸馏水稀释至 1000mL, 滤纸过滤。用牛血清白蛋白配制 100μg/mL 的标准蛋白溶液^[11]。在波长 595nm 处制作蛋白质标准曲线, 其回归方程为 $y = 0.0067x - 0.0072$, $R^2 = 0.9989$ 。

1.3.6 SOD 凝胶电泳

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[15-16]测定越橘叶 SOD 的纯化程度及相对分子质量, 进而确定纯化效果。

1.3.7 越橘叶 SOD 紫外-可见光谱扫描

将酶液稀释至适当浓度, 利用紫外-可见分光光度计在 190~1100nm 进行全波长扫描, 测定 SOD 的吸收光谱。扫描的光谱若无杂峰, 可进一步说明 SOD 的纯度。

1.3.8 原子吸收光谱法定性分析 SOD 种类

1.3.8.1 工作曲线的绘制

分别配制质量浓度为 1、3、5、7μg/mL 的 Cu/Zn、Fe、Mn 标准金属离子溶液。开机预热 30min 后, 点击“寻峰”, 参数设置, 仪器自动获取最大吸收波长, 在此工作条件下, 将配制好的同一种离子标准溶液按质量浓度由小到大进行上样, 电脑自动处理工作曲线。测定下一元素前进行元素灯更换。

1.3.8.2 样品处理

用 5mL 移液管移取 5mL 样品(1.3.3 节中冷冻干燥前的酶液)于 250mL 三角瓶中, 加入 10mL 浓硫酸、5mL H₂O₂, 放置 1h 至溶液均匀。然后将烧杯放在电热板上加热至产生的黄烟变为白烟。冷却至 50~60℃。再向烧杯中加入 5mL 浓硫酸、2.5mL HClO₄、5mL H₂O₂, 用表面皿盖住瓶口, 将烧杯放在电热板上加热消化。当溶液变为无色澄清时, 说明消化已完全^[17-19]。取下三角瓶冷却后定容至 50mL 备用。

1.3.8.3 样品测定

在 1.3.8.1 节所设置的条件下进行仪器校零, 将 1.3.8.2 节处理后的样品稀释 10 倍后上样, 点击“测量”, 待基线平稳点击“开始”, 仪器自动读取离子浓度。

2 结果与分析

2.1 选择性热变性对越橘叶 SOD 粗酶纯化影响的结果分析

2.1.1 热变性温度对越橘叶 SOD 粗酶纯化的影响

由 1.3.1 节处理得到的粗酶酶活力为 1977.2U/mL, 酶比活力为 25.5U/μg。时间为 15min, 温度分别为 55、65、75℃, 对越橘叶 SOD 进行热变处理后其酶比活力见图 1。温度为 65℃ 时酶比活力达到最大值 26.7U/μg。

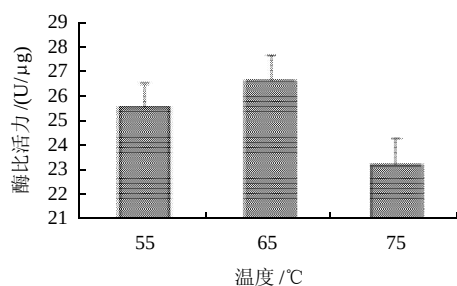


图1 热变性温度对越橘叶 SOD 粗酶纯化的影响

Fig.1 Effect of thermal denaturation temperature on SOD activity

2.1.2 热变时间对越橘叶 SOD 粗酶纯化的影响

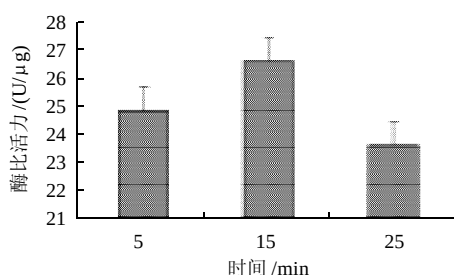


图2 热变性时间对越橘叶 SOD 粗酶纯化的影响

Fig.2 Effect of thermal denaturation duration on SOD activity

温度为 65℃ 时, 热变时间分别为 5、15、25min, 对粗酶液进行热变性处理后 SOD 酶比活力见图 2。同样, 时间为 15min, 温度为 65℃ 时酶比活力达到最大值 26.7U/μg。

2.2 越橘叶 SOD 纯化结果分析

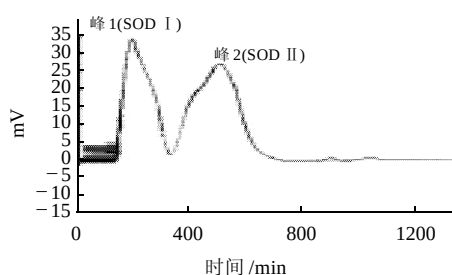


图3 越橘叶 SOD Sephadex G-75 柱层析洗脱曲线

Fig.3 Sephadex G-75 gel chromatogram of crude SOD samples

Sephadex G-75 柱层析洗脱结果见图 3, 分别测定其酶活力, 第 1 个峰 Sephadex G-75 SOD I 酶活力较高, 为 925.7U/mL, 第 2 个峰 Sephadex G-75 SOD II 酶活力为 637.8U/mL。

越橘叶 SOD 的纯化结果见表 1。超声波提取的粗酶酶活力为 1997.2U/mL, 酶比活力为 25.5U/μg; 经纯化后的 SOD 酶活力为 1563.5U/mL, 酶比活力 292.5U/μg, 回收率达 78.3%, 纯化倍数为 11.47。

表 1 越橘叶 SOD 的纯化结果

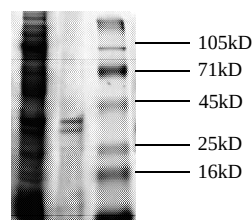
Table 1 Summary of separation and purification of SOD from blueberry leaves

纯化步骤	酶活力 / (U/mL)	蛋白含量 / (μg/mL)	酶比活力 / (U/μg)	回收率 / %	纯化倍数
粗酶液	1997.2	78.2	25.5	100.0	1
热变性	1757.9	65.9	26.7	88.0	1.05
Sephadex G-75 SOD I	925.7	5.8	159.6	78.3	11.47
Sephadex G-75 SOD II	637.8	4.8	132.9		

2.3 越橘叶 SOD 定性分析

2.3.1 SOD 电泳图谱

柱层析洗脱的活性峰电泳图谱在 32kD 和 42kD 左右有两条带。由电泳图(图 4)的条带色度可知, 42kD 条带较 32kD 条带浓。不同来源的 Cu/Zn-SOD 分子质量一般在 32kD 左右, Mn-SOD 和 Fe-SOD 分子质量在 42kD 左右^[14], 实验所得条带表明提取酶液一定含有 Cu/Zn-SOD, 可能同时含有 Mn-SOD、Fe-SOD, 或只有其中一种类型。



1. 粗酶; 2. 纯化酶; 3. 标准蛋白。

图4 越橘叶 SOD 凝胶电泳

Fig.4 SDS-PAGE of crude and purified SOD samples

2.3.2 SOD 紫外-可见光谱

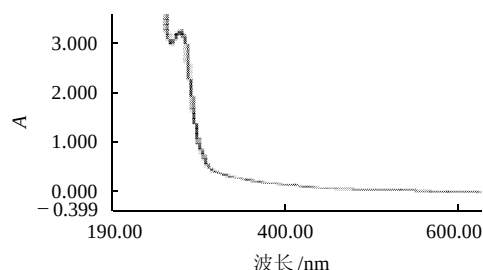


图5 样品 Sephadex G-75 SOD I 紫外吸收光谱

Fig.5 UV absorption spectrum of peak I resulting from Sephadex G-75 gel chromatographic separation

对经葡聚糖凝胶柱层析洗脱收集的 SOD I、SOD II 两个活性峰分别进行紫外-可见光谱扫描, 结果如图 5、6 所示。SOD I 和 SOD II 的最大紫外吸收峰分别在波长 280nm 和 258nm 处, 其中 280nm 波长处 $A = 3.293$; 258nm 波长处 $A = 2.635$; 无其他杂峰。进一步说明纯化效果良好。与文献[12]报道一致, Cu/Zn-SOD

的紫外吸收峰一般在波长258~260nm处, Mn-SOD和Fe-SOD的紫外吸收峰均在波长280nm处。

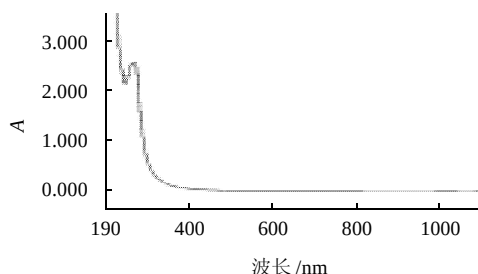


图6 样品Sephadex G-75 SOD II紫外吸收光谱

Fig.6 UV absorption spectra of peak II showed resulting from Sephadex G-75 gel chromatographic separation

2.3.3 SOD原子吸收光谱测定结果

原子吸收分光光度计自动输出结果, 越橘叶SOD中含铁离子 $5.893\mu\text{g/mL}$ 、锰离子 $3.528\mu\text{g/mL}$ 、锌离子 $1.004\mu\text{g/mL}$ 。进一步说明越橘中含有Fe-SOD、Mn-SOD、Cu/Zn-SOD。

3 讨论

本实验在SOD纯化过程中摒弃了有机溶剂法, 采用热变性法去除杂蛋白, 之后采用透析、柱层析、真空冷冻干燥进行纯化, 整个过程没有有机溶剂混入, 纯度有所提高, 并且这些纯化方法的结合和探索为今后SOD的纯化提供了更加安全、经济的解决策略, 同时, 物理纯化的方法最大限度地保证了产品应用和商业化的安全性, 使得SOD的生产工艺成本降低, 这使得从越橘中提取生产SOD有良好的应用前景。

SOD性质测定中未采用氰化物等剧毒化学试剂进行敏感性实验, 而是采用蛋白电泳、紫外-可见光谱扫描、原子吸收光谱法等先进技术进行鉴定, 相比传统的检测方法, 这些方法更加灵敏、准确、安全。

参考文献:

- [1] 陈鸿鹏, 谭晓风. 超氧化物歧化酶研究综述[J]. 经济林研究, 2007, 25(1): 59-65.
- [2] SKRZYCKI M, MAJEWSKA M, PODSIAD M, et al. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer[J]. Acta Biochimica Polonica, 2009, 56(4): 663-670.
- [3] GUO Fangxian, LIU Shouan, CHEN Jing, et al. Purification, characterization, and molecular cloning of a thermostable superoxide dismutase from *Thermosascus aurantiacus*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(4): 1090-1093.
- [4] 徐榕敏, 易焱波, 阙瑞琦, 等. 芦荟超氧化物歧化酶的纯化与部分性质[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2007, 32(3): 126-131.
- [5] 李东旭, 吴蕾, 任云霞. 超氧化物歧化酶的提取和纯化技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3): 183-186.
- [6] VYAS D, KUMAR S. Purification and partial characterization of a low temperature responsive Mn-SOD from tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 329(2): 831-838.
- [7] 祖桂芳, 赵晓红, 崔胜楠. 红豆越桔活性成分研究及开发利用[J]. 生命科学, 2009, 21(1): 151-155.
- [8] 王喜军, 范玉玲, 闫雪莹. 越桔茎叶化学成分提取分离及结构鉴定[J]. 中草药, 2002, 33(7): 595-596.
- [9] 高展. 防治糖尿病的越桔叶、豆荚等植物提取物组方[J]. 国外医药: 植物药分册, 2007, 22(4): 180.
- [10] 刘婷婷, 王海灵, 张艳荣. 玉米超氧化物歧化酶超声波提取技术的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 156-160.
- [11] 袁勤生. 超氧化物歧化酶[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2009: 112-227.
- [12] 宣景宏, 孟宪军. 红树莓超氧化物歧化酶的分离纯化[J]. 中国果树, 2007(1): 11-13.
- [13] 董长颖, 张巧. 三种芦荟超氧化物歧化酶的活性测定[J]. 北方园艺, 2009(5): 97-99.
- [14] 蔡骏, 李颖, 尹宗宁. 邻苯三酚法测定超氧化物歧化酶缓释片中SOD的活性[J]. 华西药理学杂志, 2005, 20(1): 54-55.
- [15] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 1-312.
- [16] ZHAO T T. 蛋白质提取与制备[J]. 生命科学趋势, 2003, 1(4): 103-115.
- [17] JENG S L, LEE S J, LIN S Y. Determination of cadmium and lead in raw milk by graphite furnace atomic absorption spectrophotometer[J]. Journal of Dairy Science, 1994, 77(4): 945-949.
- [18] 张绍军, 孟泉科, 张力. 火焰原子吸收分光光度法测定蔬菜中铜、锌、铅[J]. 广州化工, 2009, 37(4): 145-146.
- [19] 栾芳, 冯艳茹. 火焰原子吸收光谱法测定7种乳制品中微量元素及乳酸的含量[J]. 黑龙江医药科学, 2006, 29(4): 14-15.