

# 猴头子实体锰型超氧化物歧化酶的 纯化及其性质鉴定\*

吴国荣 邹玉珍 程光宇 陶明煊

(南京师范大学生物系, 南京 210097)

**摘要** 猴头 (*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.) 子实体的超氧化物歧化酶仅 Mn-SOD 1 种, 有其资源和学术研究上的意义。其粗酶液经  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  盐析,  $\text{DE}_{52}$  和  $\text{CM}_{52}$  离子交换柱层析, 纯化到电泳单斑点均一程度, 其比活性为 3 096.5 u/mg, 活性回收率为 14.8%。纯化的 Mn-SOD 分子量为 47.0 KD, 亚基分子量为 23.3 KD。金属元素分析表明每个亚基含 1 个 Mn 原子。该酶在紫外区有 2 个吸收峰, 分别在 218.4 nm 和 276.0 nm。该酶的理化性质与文献报道的不同来源的 Mn-SOD 大致相同。

**关键词** 锰型超氧化物歧化酶; 猴头子实体; 纯化; 性质

**Purification of Mn-superoxide dismutase from *Hericium erinaceus* and the identification of its properties** Wu Guo-Rong, Zhou Yu-Zheng, Cheng Guang-Yu and Tao Ming-Xuan (Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097), *J. Plant Resour. & Environ.* 1996, 5(2): 9~14

Only one kind of Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) was found in the crude extract from *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. In this case there are significance of resources and scientific study. The enzyme was isolated and purified to homogeneity by ammonium sulfate fraction,  $\text{DE}_{52}$  and  $\text{CM}_{52}$  chromatography, and the rate of activity yield is 18.8%. The enzyme had a specific activity of 3 096.5 u/mg, and exhibited two absorption peaks in the ultraviolet at 218.4 nm and 276.0 nm respectively. The purified enzyme Mn-SOD has a relative molecular mass of 47.0 KD and the molecular mass of subunit is 23.3 KD. Analysis of metallic elements demonstrated that every subunit contains one Mn atom. The physiochemical properties of the enzyme are roughly the same with the same kind of SOD from different sources reported by literatures.

**Key words** Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD); *Hericium erinaceus*; purification; property

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, ECI.15.1.1, 简称 SOD)是广泛存在于需氧和耐氧生物机体内的金属酶, 按其金属辅基的不同, 可分为 Cu·Zn-SOD, Mn-SOD 和 Fe-SOD。大量研究证实, 多种疾病的起因均与超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )有关, 而 SOD 则是细胞内清除活性氧的主要保护酶<sup>[20]</sup>, 成为当前有关学科的研究热点<sup>[2,4]</sup>。

自 1970 年 Keele 等从大肠杆菌 B 中分离出 Mn-SOD<sup>[16]</sup>后, 相继从多种植物中分离纯化了该酶<sup>[15,22,23]</sup>, 但迄今尚未见除酵母菌之外其他真菌 Mn-SOD 提取和纯化的报道。作者在筛选

富含 SOD 植物资源的工作中,发现食用、药用真菌普遍富含 Mn-SOD, 确认云芝、金针菇、香菇中 SOD 的主要类型为 Mn-SOD, 其占 SOD 总活性均在 60% 以上。而猴头子实体中只有 Mn-SOD 1 种<sup>[7]</sup>。本文报告猴头菌子实体 Mn-SOD 的分离纯化及其性质鉴定。

## 1. 材料与方 法

### 1.1 材 料

猴头菌 (*Hericium erinaceus* (Bull.) Pors) 子实体是南京老山林场真菌研究所赠与, 经表面清洗和消毒处理后, 贮存在  $-25^{\circ}\text{C}$  条件下备用。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 猴头子实体 SOD 粗酶液的制备及其 Mn-SOD 的纯化

将已清洁的新鲜猴头菌子实体撕碎, 按每克组织加入 4 ml 预冷的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.8, 含 1 mmol/L EDTA) 捣碎 (8 000~10 000 r/min), 经 6 层纱布过滤, 滤液用 JY88-II 型超声波细胞破碎机处理 30 min (冰浴冷却, 140 W, 其间工作 30 s, 间隙 30 s), 然后于  $4^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 20 min, 弃沉淀, 上清液即为粗酶液。在粗酶液中加入硫酸铵至 35% 饱和度, 冰浴冷却, 搅拌 2 h 后,  $4^{\circ}\text{C}$ 、15 000 g 离心 30 min, 弃沉淀, 上清液再加硫酸铵至 85% 饱和度, 冰浴冷却, 搅拌 2 h,  $4^{\circ}\text{C}$  静置过夜, 再以  $4^{\circ}\text{C}$ 、20 000 g 离心 30 min, 收集沉淀。沉淀物用少量磷酸钾缓冲液 (pH 7.8, 5 mmol/L, 含 0.1 mmol/L EDTA) 溶解, 并用同样的缓冲液,  $4^{\circ}\text{C}$  透析 36 h, 将透析后的样品离心后通过  $\text{DE}_{52}$  层析柱 (2 cm  $\times$  25 cm), 用同样的缓冲液洗脱, 控制流速为 16 ml/h, 每管收集 4 ml 洗脱液, 分别测定 Mn-SOD 活性和蛋白质含量, 在洗脱后期出现活性峰, 结果见图 1。合并活性峰, 冷冻干燥后用少量醋酸盐缓冲液 (pH 5.5, 40 mmol/L) 溶解, 再对同样的缓冲液  $4^{\circ}\text{C}$  透析 24 h, 透析后的样品上  $\text{CM}_{52}$  柱 (2 cm  $\times$  25 cm), 用与透析相同的缓冲液充分淋洗, 以去除杂蛋白, 接着用 40~200 mmol/L, pH 5.5 的醋酸缓冲液进行线性梯度洗脱, 流速控制为 8 ml/h, 每管 4 ml 作部分收集, 测定 SOD 活性和蛋白质含量, 结果见图 2。合并收集 SOD 活性峰, 对水透析后冷冻干燥, 得浅褐色 SOD 粉末。

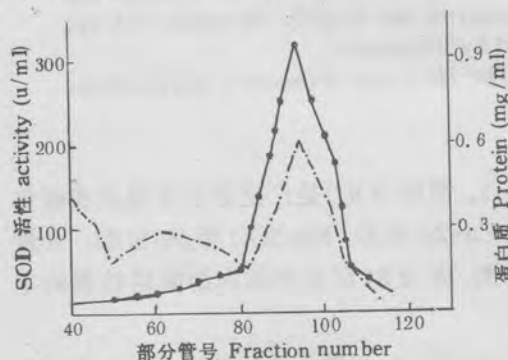


图 1 猴头子实体 Mn-SOD 的  $\text{DE}_{52}$  柱层析  
Fig 1 Chromatography of Mn-SOD from *Hericium erinaceus* on  $\text{DE}_{52}$

—●— SOD Activity; --- Protein

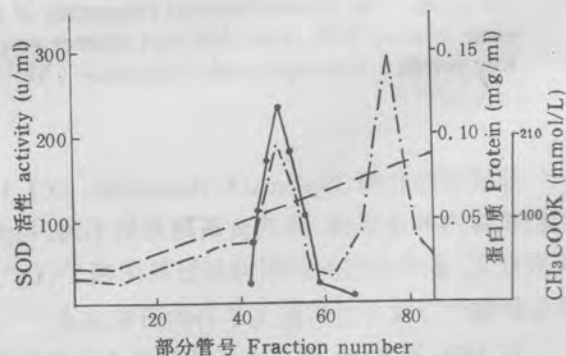


图 2 猴头子实体 Mn-SOD 的  $\text{CM}_{52}$  线性梯度柱层析  
Fig 2 Linear gradient chromatography of Mn-SOD from *Hericium erinaceus* on  $\text{CM}_{52}$

—●— SOD Activity; --- Protein; ---  $\text{CH}_3\text{COOK}$

1.2.2 酶活性测定 粗酶液及其纯化各步骤后酶活性测定按 Stewert 和 Bewley 方法<sup>[24]</sup>, 在 2 mmol/L 的 KCN 存在的条件下进行。

1.2.3 蛋白质含量测定 按 Bradford 方法<sup>[14]</sup>, 以牛血清白蛋白作标准蛋白。

1.2.4 酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳和活性染色 参照罗广华和王爱国的方法<sup>[9]</sup>, 分离胶浓度为 10%。

1.2.5 SOD 类型鉴定 Mn-SOD 能被氯仿-乙醇抑制, 但不受 KCN 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的影响; Cu·Zn-SOD 与之相反; 而 Fe-SOD 仅能被 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所抑制<sup>[3, 23]</sup>; 根据此原理鉴定同工酶类型。实验以不同抑制条件下凝胶电泳 SOD 活性染色定位鉴定为主, 同时也测定加入不同抑制剂后的 SOD 残存活性。

1.2.6 酶的紫外吸收光谱测定 用岛津 UV-250 紫外可见分光光度计测定。

1.2.7 酶的分子量与亚基分子量的测定 酶分子量采用 Sephadex G-100 凝胶过滤测定; 亚基分子量应用 SDS-PAGE 法测定, 分离胶浓度为 11%。

1.2.8 等电聚焦电泳 按袁玉荪等的方法<sup>[11]</sup>测定。

1.2.9 金属元素分析 在 1100+2000 型电感耦合等离子直读光谱仪(美国 Jarrell-Ash 公司)上进行。

1.2.10 氨基酸组成分析 按 Pico-Tag<sup>TM</sup>氨基酸分析系统方法进行。色氨酸含量按蔡武城和袁积厚的荧光法<sup>[13]</sup>, 在岛津 RF-540 荧光分光光度计上进行。

## 2. 结果与分析

### 2.1 酶的纯化和鉴定

2.1.1 酶的分离纯化 猴头菌子实体中 Mn-SOD 分离纯化各步骤的结果见表 1。1 000 g 鲜猴头子实体纯化后得 1.54 mg Mn-SOD 蛋白, 酶比活性为 3 076.5 u/mg, 纯化 87.9 倍, 此酶比活性与酵母和豌豆的基本一致<sup>[21, 22]</sup>。活性回收率为 14.8%。

表 1 猴头子实体 Mn-SOD 的纯化

Tab 1 Purification of Mn-SOD from *Hericium erinaceus*

纯化步骤 Purification step	总体积 Total volume (vol)	总蛋白 Total protein (mg)	总活性 Total activity (units)	比活性 Specific activity (units/mg protein)	纯化倍数 Purification (fold)	回收率 Yield (%)
粗酶液 Crude extract	4230	917.4	32109.0	35.0	1	100
35% - 85% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	136	229.5	22187.3	96.7	2.76	69.1
DE <sub>52</sub>	112	26.4	11430.8	432.9	12.37	35.6
CM <sub>52</sub>	57	1.54	4752.1	3076.5	87.9	14.8

2.1.2 酶的纯度和类型鉴定 将纯化的酶经聚丙烯酰胺垂直平板凝胶电泳后, 胶片切成两部分, 分别进行 SOD 活性染色和蛋白染色, 两者都呈现单一的区带, 电泳迁移率完全一致(图 3-A2, 6); 再经不连续系统 SDS-PAGE 电泳蛋白染色, 纯化的活性组分呈现一条谱带(图 3-B); 管式凝胶等电聚焦电泳也呈现一条蛋白区带(图 3-C); 均表明经纯化获得 SOD 组分已达到电泳纯的水平。该酶对 KCN 不敏感, 2 mmol/L KCN、25℃ 处理 10 min, 活性谱带不受影响; 对氯仿-乙醇混合液(2:3/V:V)敏感, 与酶液比为 1:4(V:V)时, 活性即受到抑制, 增至 1:2

时酶活性完全抑制,酶带在电泳图谱上消失(图3-A3~5),由此确定该酶为 Mn-SOD。

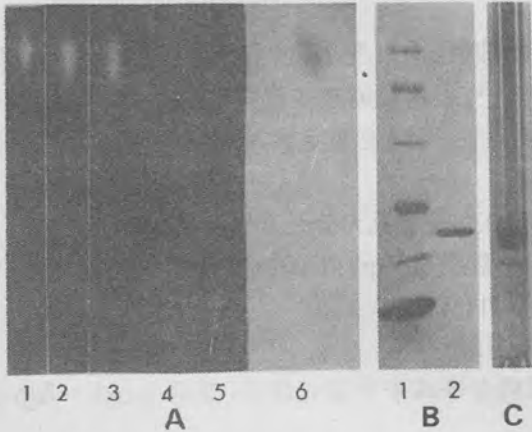


图3 猴头子实体 Mn-SOD 凝胶电泳图

Fig 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of Mn-SOD from *Hericium erinaceus*

A1, Activity dyeing of crude extract of the SOD; A2~5, Effect of the inhibitors on activity of the purified SOD (Activity dyeing); A2, Control; A3, KCN (2 mmol/L); A4, Chloroform-ethanol: extract (1:4); A5, Chloroform-ethanol: extract (1:2); A6, Protein dyeing of the purified SOD (0.5  $\mu$ g protein); B, SDS-PAGE; B1, Standard proteins; B2, the purified SOD; C, Isoelectric focusing electrophoretogram of the purified SOD

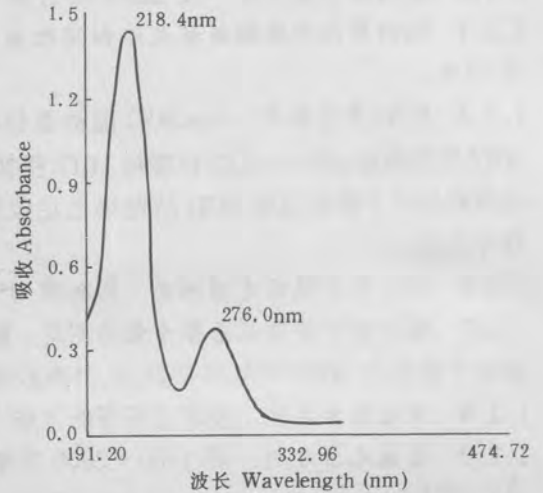


图4 猴头子实体 Mn-SOD 的紫外吸收光谱

(酶浓度 0.273 mg/ml, 光径 1 cm)

Fig 4 Ultraviolet absorption spectrum of Mn-SOD from *Hericium erinaceus*

(with a protein concentration of 0.273 mg/ml and a light path of 1 cm)

## 2.2 酶的理化性质

2.2.1 紫外吸收光谱 纯化酶在紫外光区的吸收曲线呈现两个最大吸收峰(图4),一个在 218.4 nm 处,另一个在 276.0 nm 处,属于 Mn-SOD 的吸收特征<sup>[10]</sup>。

2.2.2 分子量和亚基分子量 用 Sephadex G-100(2 $\times$ 85 cm)凝胶过滤法测定该酶的分子量,流速 20 ml/h,酶的洗脱体积为 138 ml,以牛血清白蛋白、卵清蛋白、胰蛋白酶及细胞色素 C 作的标准曲线上查得酶分子量为 47.0 KD。采用 SDS-PAGE 法测定酶亚基分子量,电泳图谱呈现一条带,以 6 种标准蛋白作半对数标准曲线,测得亚基分子量为 23.3 KD,与面包酵母、豌豆等的 Mn-SOD 亚基分子量很接近<sup>[10,21,22]</sup>。该酶由两个结构相同的亚基组成。

2.2.3 酶的稳定性 同一酶液在不同的温度下保温 20 min 后,迅速冷却至 4 $^{\circ}$ C,测定酶活性,结果见图 5-A。纯化的酶在 50 $^{\circ}$ C 以下是稳定的,高于 50 $^{\circ}$ C 时酶开始部分失活,60 $^{\circ}$ C 后迅速失活;而未纯化的粗酶 60 $^{\circ}$ C 时基本保持酶的活性。

将同一酶液分别加进 pH 值不同的 30 mmol/L 柠檬酸-磷酸二氢钾-硼酸-巴比妥缓冲液中,在 25 $^{\circ}$ C 下保温 30 min,冷却至 4 $^{\circ}$ C 测定酶活性,结果见图 5-B。纯酶在 pH 6~11 之间稳定,在酸性条件下几乎呈线性衰减,粗酶稳定的 pH 范围较前者稍宽。

脲是常见的蛋白变性剂,将同一酶液分别加进不同浓度的脲溶液中,25 $^{\circ}$ C 保温 30 min,冷却至 4 $^{\circ}$ C,测定酶活性,结果见图 5-C。纯酶在 4 mol/L 脲浓度以下酶相对稳定,5 mol/L 以

上迅速失活,而粗酶在 7 mol/L 浓度时,仍保持稳定。猴头 Mn-SOD 表现出对脲的相对稳定性,与前人的实验相类似<sup>[8]</sup>。以上的稳定性试验结果表明,粗酶均较纯化酶好,可能是粗酶中的其他成分对 SOD 起着某种“保护”作用。

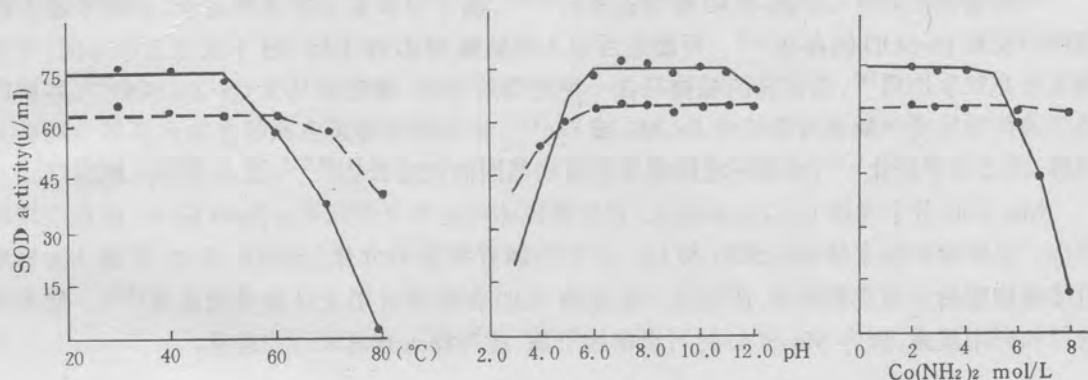


图 5 温度、pH 和脲对猴头子实体 Mn-SOD 活性的影响

Fig 5 Effects of temperature, pH and urea on Mn-SOD activity from *Hericium erinaceus*

— 纯酶 Purified extract    - - - 粗酶 Crude extract

2.2.4 金属元素分析 纯酶对 5 mmol/L 的磷酸缓冲液透析后,再对重蒸水透析,将透析液冷冻干燥后用于金属元素含量测定。结果为每毫克酶蛋白中含锰 0.203%,相当于每个亚基含 0.86(整数为 1)个锰原子,和大肠杆菌 B<sup>[16]</sup>、面包酵母<sup>[21]</sup>的 Mn-SOD 相似。

2.2.5 酶的等电点及氨基酸组成 纯酶在 pH 3.5~10 的两性电解质中等电聚焦电泳 5 h,经考马斯亮兰 R250 染色后,呈现一条蛋白带,相对应的 pH 值为 6.43。表 2 是猴头 Mn-SOD 的氨基酸组成,与不同来源的 Mn-SOD 非常相似,但含有较高的丙氨酸。其中碱性氨基(Arg, Lys 和 His)与酸性氨基酸(Glu, Asp)比值为 1:1.6,与酵母等的比值接近<sup>[1,21]</sup>。

表 2 猴头子实体 Mn-SOD 氨基酸组成

Tab 2 Amino acid composition of Mn-SOD from *Hericium erinaceus*

氨基酸 Amino acid	氨基酸残基数/亚基 Residues/subunit	氨基酸 Amino acid	氨基酸残基数/亚基 Residues/subunit	氨基酸 Amino acid	氨基酸残基数/亚基 Residues/subunit
Lys	16	Pro	11	Ile	11
His	7	Gly	21	Leu	16
Arg	4	Ala	29	Tyr	5
Asp	24	1/2Cys	0	Phe	7
Thr	9	Val	10	Trp	7
Ser	12	Met	1	总数 total	210
Glu	20				

### 3. 讨 论

目前从各种生物材料中提取 Mn-SOD 的回收率都较低,一般在 7%~16% 之间<sup>[1,19,23]</sup>,与



Cu·Zn-SOD 纯化回收率相比还有差距。作者在纯化过程中舍弃了热变性的步骤<sup>[22]</sup>,回收率也仅达 14.8%,其主要原因是纯化过程中 Mn-SOD 活性易遭受破坏,可能与 Mn-SOD 的结构特点、性质与纯化时的方法和参数有关,作者已经注意到酶纯化过程中,在偏酸条件下处理时,辅基 Mn 的解离和酶活性的损失(资料未列入)。有报道从菠菜中提纯 Mn-SOD 时 Mn 的损失<sup>[15]</sup>。因此,有必要进一步研究纯化流程,提高回收率。

一般植物都具有 Cu·Zn-SOD 和 Mn-SOD<sup>[3,23]</sup>,由于分析鉴定技术的进步,在越来越多的植物中发现 Fe-SOD 的存在<sup>[12]</sup>。可能是因为 3 种类型 SOD 在不同 pH 下反应速率不同,可以相互补充发生作用<sup>[1]</sup>,然而有的植物只含一种类型的 SOD,如白及只含 Cu·Zn-SOD<sup>[6]</sup>,其原因是否该植物生境中缺乏可吸收的 Fe、Mn 或 Cu<sup>[17]</sup>;或是基因物质从原核生物到真核生物独立转移,然后集中进化<sup>[25]</sup>;或是环境影响导致植物基因的选择表达<sup>[3,23]</sup>,这有待深入地探讨。

Mn-SOD 分子量较 Cu·Zn-SOD 大,在生物机体内的半衰期较 Cu·Zn-SOD 长,而毒性较后者小。有实验数据支持 Mn-SOD 与 O<sub>2</sub><sup>-</sup>水平控制着细胞的分化、分裂和衰老,外源 Mn-SOD 可使癌细胞的分裂受到抑制,所以这一类型的 SOD 在临床应用上日益受到重视<sup>[2,5]</sup>。猴头等食用和药用真菌,作为 Mn-SOD 的可贵植物资源,还有深入开发利用的前景。

#### 参 考 文 献

- 1 方允中,李文杰主编. 1989: 自由基与酶, 科学出版社, 北京. 70, 106, 124.
- 2 方允中. 1993: 自由基生命科学进展 1: 67~69.
- 3 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 1989: 中国科学院华南植物研究所集刊(5), 科学出版社, 北京. 11.
- 4 李文杰. 1988: 生化药物杂志 2: 9~16.
- 5 李性天. 1988: 生化药物杂志 2: 16~19.
- 6 吴国荣, 魏锦城, 程光宇等. 1994: 植物资源与环境 3(3): 14~21.
- 7 邹玉珍, 吴国荣, 程光宇等. 1991: 南京师大学报(自然科学版) 14(2): 117~120.
- 8 罗广华, 邵从本, 王爱国等. 1984: 植物生理学报 10(2): 175~179.
- 9 罗广华, 王爱国. 1983: 植物生理学通讯 6: 44~46.
- 10 赵厚安, 方允中. 1988: 军事医科学院院刊 58: 414~417.
- 11 袁玉荪, 朱婉华, 陈均辉编. 1988: 生物化学实验(第二版), 高等教育出版社, 北京. 99.
- 12 程光宇, 魏锦城, 吴国荣等. 1994: 植物生理学报 20(2): 128~136.
- 13 蔡武城, 袁积厚主编. 1982: 生物物质常用化学分析方法, 科学出版社, 北京. 72.
- 14 Bradford M M. 1976: *Anal. Biochem.* 72: 248~254.
- 15 Hayakawa T, S Kanematsu, K Adada. 1985: *Plants* 166: 111~116.
- 16 Keele B B, J M Mc Cord, I Fridovich. 1970: *J. Biol. Chem.* 245: 6176~6181.
- 17 Kono Y, M Takahashi, K Asada. 1979: *Plant and Cell Physiol.* 20(7): 1229~1235.
- 18 Marvin L S, M B Susan. 1982: *Plant Physiol.* 69: 161~167.
- 19 McCord J M, J A Boyle, E D Day *et al.* 1977: *Superoxide and Superoxide Dismutase*, Academic Press, New York. 129.
- 20 McCord J M, I Fridovich. 1969: *J. Biol. Chem.* 244: 6049~6055.
- 21 Ravindranath S D, I Fridovich. 1975: *J. Biol. Chem.* 250: 6107~6112.
- 22 Sevilla F, J Gorge, M Gomez. 1980: *Planta* 150: 153~157.
- 23 Steffen S, K Silke, W Gunnar. 1994: *Plant Cell Physiol* 35(6): 859~867.
- 24 Stewert R C, J D Bewley. 1980: *Plant Physiol.* 65: 245~248.
- 25 Wingsle G, P Gardestrom, J E Hallgren *et al.* 1991: *Plant Physiol.* 95: 21~28.

(责任编辑: 许定发)