

白及块茎铜、锌超氧化物歧化酶的 纯化及其性质

吴国荣 魏锦城 程光宇 张卫明

(南京师范大学, 南京 210024)

摘要 白及(*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.)的SOD同工酶只有一条较宽的谱带,确认为Cu·Zn-SOD。其块茎SOD总活性和比活性都高,且含有丰富的白及胶;经丙酮分级沉淀, Sephadex G100凝胶过滤和DEAE-纤维素柱层析分离纯化,获得对CN⁻敏感的淡蓝色Cu·Zn-SOD粉末。在凝胶电泳染色图谱上,纯化后的酶与粗酶液的SOD区带相对应,且其酶活性染色带与蛋白染色带位置对应,表明已纯化到均一程度。该酶分子量约33KD,亚基分子量约为16.4KD;紫外光区的吸收峰在264.6nm,等电聚焦电泳呈现一条蛋白区带,pH值在4.35左右;该酶在pH6.0~10.0,温度在50℃范围内具稳定性。纯化后的酶为4563.2u/mg·蛋白,纯化了51倍,活力回收为22.3%。上述酶没有过氧化氢酶活性。提取过程中还得到高质量的副产品白及胶。

关键词 超氧化物歧化酶;白及;块茎;纯化

Purification and some properties of copper/zinc superoxide dismutase in the tuber of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. Wu Guo-Rong, Wei Jin-Cheng, Cheng Guan-Yu and Zhang Wei-Ming (Nanjing Normal University, Nanjing 210024), *J. Plant Resour. & Environ.* 1994, 3(3): 14~21

The isozyme of SOD in *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. has only a single broad band which identified as Cu·Zn-SOD. Both the total and relative activities of SOD in the tuber are higher, and rich of *Bletilla* glue. After gradient precipitate, sephadex G100 gel filtration and DEAE-cellulose column chromatographic isolation and purification, a light-blue and CN⁻-sensitive powder of Cu·Zn-SOD was obtained. On gel-electrophoresis chromatogram, the dividing zone of the purified enzyme is correspond with the crude extracts, moreover, the stained band of this enzymic activity identifies with that of enzymic protein, it demonstrated that this enzyme might be purified to a homologueous form. The M. W. of the enzyme is about 33 KD, the subunit is 16.4 KD. The peak of U. V. absorption band is 264.6 nm, and shows single band on isofocus electrophoresis, it's isoelectric point is about pH 4.35. The enzyme is stable under the condition of pH6.0~10.0 and 50℃. The purified enzyme is 4563.3 unit per mg protein, so that it is purified by 51 fold, the rate of recovery of activity is 22.3%. The enzyme does not express the activity of catalase. A by-product, high quality *Bletilla* glue was also obtained from extractive process.

Key words superoxide dismutase; *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.; tuber; purification

超氧化物歧化酶^[16](EC. 1.15.1.1 Superoxide Dismutase, 简称SOD)是催化超氧阴离子自由

基(O_2^-)发生歧化反应的一类金属酶。自1969年 MoCord 和 Fridovich^[17]发现 SOD 后,这一领域内的研究成果受到生物、医学科学工作者的普遍关注,大量的文献报道 SOD 的存在具有重要的生物学意义,应用前景广阔^[4]。

近年来,高等植物的 SOD 研究引人注目,已从多种植物中纯化分离出 Cu·Zn-SOD^[7,11,14,15]。前人的研究表明,一般植物都具有 Cu·Zn-SOD 和 Mn-SOD,且其同工酶谱带不是单一的,理化性质因植物种而有一定差异。我们在富含 SOD 植物的筛选过程中,先后分离纯化了枸杞、茶叶、花生、猴头菌等植物的 Cu·Zn-SOD、Mn-SOD 及 Fe-SOD^[1,2,5];并发现传统的植物药白及 (*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.) 的 SOD 只有一条较宽的谱带,确认为 Cu·Zn-SOD,其总活性和比活性都高^[8]。本文报道白及块茎 Cu·Zn-SOD 的纯化及其性质,为深入开发利用该植物药提供参考。

1. 材料与方 法

1.1 材 料

新鲜白及 (*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.) 块茎采自南京师范大学生物系植物园。经表面清洗、消毒处理后贮存在-25℃条件下备用。

试剂为 Sephadex G100 (Pharmacia)、DEAE-Cellulose [DE₅₂] (Whatman)、SDS (Serva)、牛血清白蛋白 (Serva)、SDS-PAGE 标准蛋白 (Sigman)、其他标准蛋白 (Sigman)、甲义丙烯酰胺 (Fluka)、两性电解质载体 (上海试剂二厂)、NBT (上海前进试剂厂),其他试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 方 法

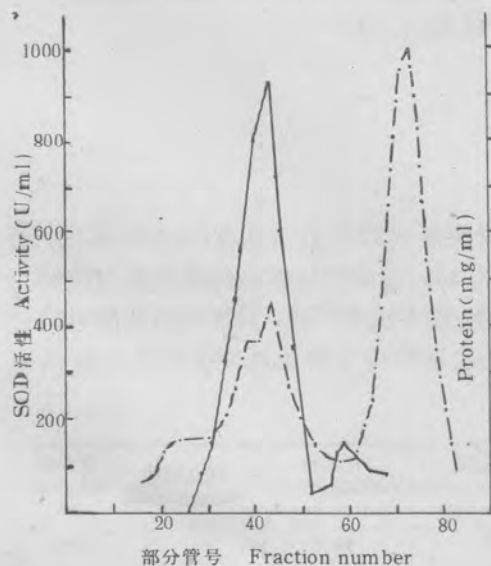


图1 白及 SOD 的 Sephadex G100 柱层析

Fig1 Chromatography of the SOD from *Bletilla striata* on Sephadex G100

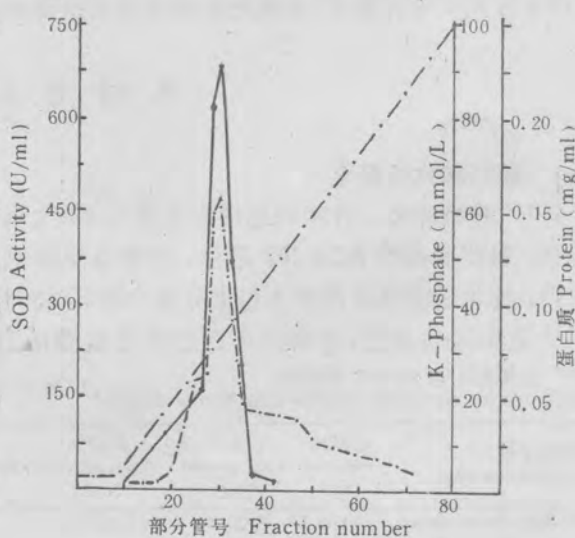


图2 白及 SOD 的 DEAE-纤维素 (DE₅₂) 线性梯度层析

Fig 2 Linear gradient Chromatography of the SOD from *Bletilla striata* on DEAE-Cellulose (DE₅₂)

1.2.1 酶的提取和纯化 白及块茎切成 $2 \times 2 \times 2$ mm的小块,按1:6 (w/v)加入缓冲液(50 mmol/L 磷酸缓冲液,内含0.1 mmol/L的EDTA, pH 7.8),置高速捣碎机中捣碎,并经超声波破碎(JY 88-II型超声波细胞破碎机,冰浴冷却,120 W进行超声处理30 min,其间工作30 S,间隙30 S),用六层纱布过滤,滤液 4°C 、15 000 g,离心20 min,弃沉淀物,上清液即粗酶液。在此粗酶液中,按0.5倍体积加入 -20°C 预冷的丙酮,搅拌30 min, 4°C 、15 000 g离心15 min,分离沉淀物。沉淀物主要是白及胶。再向上清液中缓缓加入1倍体积预冷的丙酮,搅拌30 min, 4°C 、18 000 g离心20 min,收集沉淀物。将沉淀用少量5 mmol/L磷酸缓冲液(内含0.01 mmol/L的EDTA, pH 7.8)溶解后上Sephadex G100层析柱(2×90 cm),用同样的缓冲液洗脱,控制流速16 ml/h,每管4 ml部分收集,分别测定蛋白质和SOD活性。结果见图1, SOD为单一峰,蛋白质分布曲线出现两个峰,前峰与SOD活性峰重合。合并SOD活性部分。上DEAE-Cellulose[DE₅₂]柱(2.5×35 cm),用5 mmol/L磷酸钾缓冲液充分淋洗,流速为30 ml/h,以去除杂蛋白。然后用5~100 mmol/L磷酸钾缓冲液(pH 7.8)进行线性梯度洗脱,控制流速为12 ml/h,每管4 ml作部分收集。测定SOD活性和蛋白质。图2显示单一的突出的SOD活性峰,且与蛋白峰相重合,合并SOD活性峰。经水透析,冷冻干燥,得到呈微兰色的SOD粉末。

1.2.2 酶活性测定 基本按Giannopolitis等^[14]的方法进行。反应液3 ml内含1.3 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素、13 mmol/L甲硫胺酸、75 $\mu\text{mol/L}$ NBT、 10^{-6} mmol/L EDTA、50 mmol/L (pH 7.8)的磷酸缓冲液,加入适量酶液后,在 25°C 4 000 Lux下光照15 min,随后用722型光栅分光光度计在560 nm下测光密度,以缓冲液作空白,抑制NBT光化还原50%作为一个酶活性单位。

1.2.3 蛋白质等的测定方法 蛋白质浓度测定按Bradford法^[12]。酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳及其活性染色参照罗广华等的方法^[6]。酶的分子量应用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法^[10]。亚基分子量采用SDS-PAGE法^[18]。等电聚焦电泳用袁玉荪等的方法^[9]。紫外吸收光谱用Lambda 17 UV/Vis分光光度计测定。过氧化氢酶活力测定用Beers和Sizer方法^[13]。

2. 结果与分析

2.1 酶的纯化和鉴定

2.1.1 酶的纯化 各步纯化结果见表1。230 g白及鲜块茎SOD的总活性有104 045单位,经纯化,最终总活性为23 202单位,活性总回收率为22.3%。起始比活性为每毫克蛋白质88.7单位,纯化后的终比活性为每毫克蛋白质4 563.3单位。按方法中所述,对纯化后的酶进行过氧化氢酶活性测定,结果不存在过氧化氢酶活力;经电泳图谱分析及其部分理化性质的研

表1 白及块茎Cu·Zn-SOD的纯化

Tab 1 Purification of Cu·Zn-SOD from *Blettila striata*

纯化步骤 Purification steps	总体积 Total vol (ml)	总蛋白 Total protein (mg)	总活性 Total activity (unit)	酶活性 Enzymic activity (unit/ml)	比活性 Specific activity (unit/mg protein)	纯化倍数 Purified times	回收率 Recovery (%)
粗酶液 Crude extract	1150.0	1173.0	104045.0	90.4	88.7	1	100
丙酮沉淀 Acetone precipitation	12.1	370.8	79282.3	6552.2	213.8	2.41	76.2
Sephadex G100	92.1	60.1	50565.9	549.2	841.2	9.48	48.6
DEAE-cellulose	45.8	5.08	23202.0	506.8	4563.3	51.45	22.3

究,证实所得酶已达均一程度,纯化了51倍。

将植物组织中 Cu·Zn-SOD 纯化到均一程度,一般都经过硫酸铵分部沉淀,或经氯仿-乙醇处理后再进行丙酮分部沉淀^[1,5,7,11,14,15]。鉴于白及仅一条 Cu·Zn-SOD 同工酶带,且块茎内含大量的白及胶可回收利用,所以直接用冷丙酮分部沉淀,简化了 SOD 的纯化步骤,也使白及胶的后继处理较为方便。

2.1.2 同工酶谱与酶类型 白及块茎 SOD 粗酶液与纯化酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳活性染色见图3(A),两者都呈现一条活性带,且完全相对应。该酶对氯仿-乙醇混合液不敏感,对 KCN 敏感,经 0.05 mmol/L KCN 25°C, 10 min 处理,酶活性就受到抑制,0.5 mmol/L 浓度时酶完全失活,酶带在电泳图谱上消失(图3, B_{2,3})。这一结果与酶活性的氯仿-乙醇混合液和 KCN 抑制试管试验一致,与粗酶液相比,纯化酶对 KCN 更敏感,在 0.05 mmol/L 的 KCN, 25°C, 10 min 处理,抑制粗酶液活性的 30%,而纯化酶活性的 85% 以上被抑制(图4)。确认白及块茎 SOD 是 Cu·Zn 型的⁽⁸⁾。

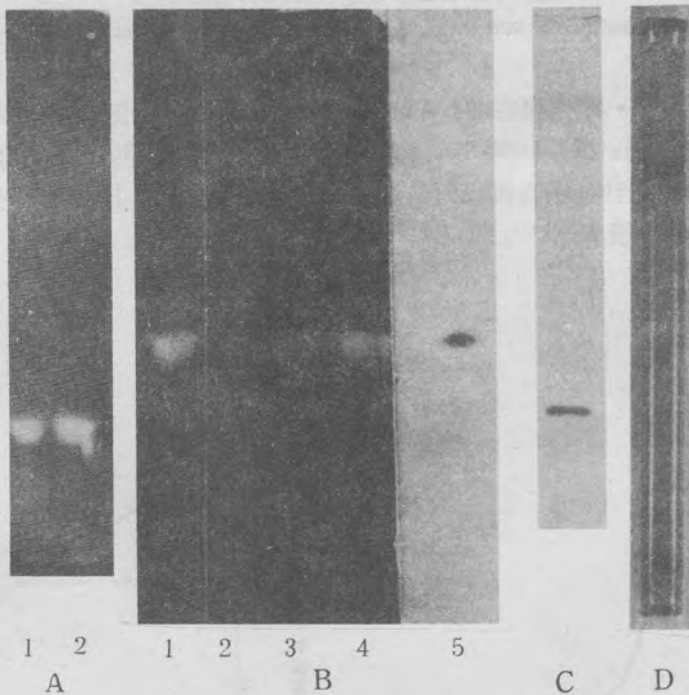


图3 白及 SOD 凝胶电泳图

Fig 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of the SOD from *Bletilia striata*

- A(T=7.5%) A₁ Activity dyeing of the purified SOD; A₂ Activity dyeing of crude extract of the SOD;
 B(T=10%) 1~4 Effect of the inhibitors on activity of the purified SOD; B₁ Control; B₂ KCN (0.5 mmol/L); B₃ KCN (0.05 mmol/L); B₄ Chloroform-ethanol, purified extract (1:1); B₅ Protein dyeing of the purified SOD (0.5 μg Protein);
 C(T=10%) SDS-polyacrylamide gel electrophoretogram of the purified SOD;
 D Isoelectric focusing electrophoretogram of the purified SOD.

2.1.3 酶纯度鉴定 纯化酶在垂直平板凝胶电泳图谱上,蛋白染色和 SOD 活性染色均显示

单一区带,且完全对应(图3, B₅)。在 SDS-PAGE 电泳图谱上纯化酶也只呈现一条带(图3, C),表明该酶已达均一程度。

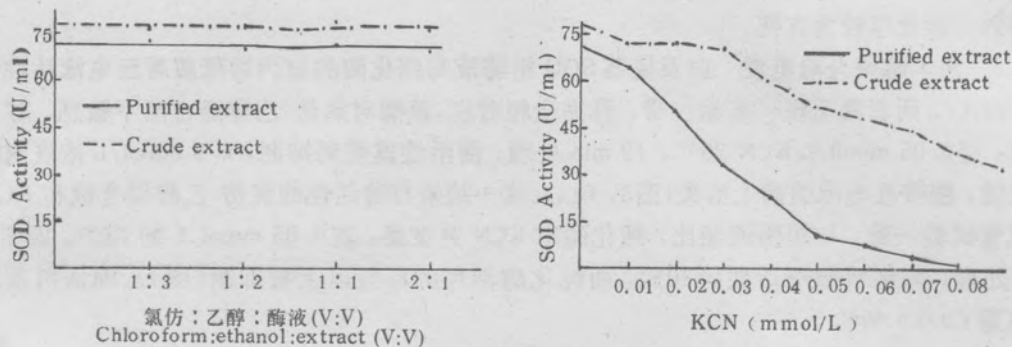


图4 KCN和氯仿-乙醇对白及SOD活性的抑制

Fig 4 Inhibition of SOD activity from *Bletilla striata* by KCN and Chloroform-ethanol

2.2 酶的理化性质

2.2.1 紫外吸收光谱 纯化酶在264.6 nm处有一最大吸收峰(图5),与Mn-SOD和Fe-SOD典型的紫外吸收峰不同,属Cu·Zn-SOD的吸收特征^[5,11,14,15]。不同来源的Cu·Zn-SOD紫外吸收峰,有偏离蛋白质的特征吸收波长而向短波部位移动的现象,其原因在于该酶分子中Trp、Tyr、Phe含量少或根本没有^[1,5,11]。

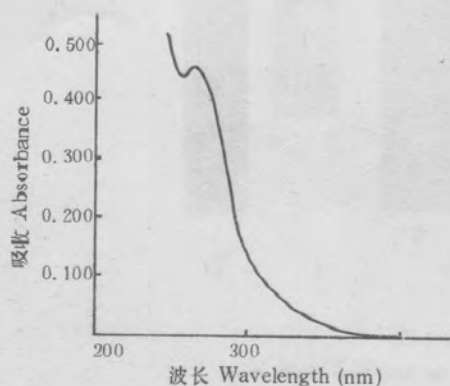


图5 白及Cu·Zn-SOD紫外吸收曲线

Fig 5 Ultraviolet absorption Spectra of Cu·Zn-SOD from *Bletilla striata*

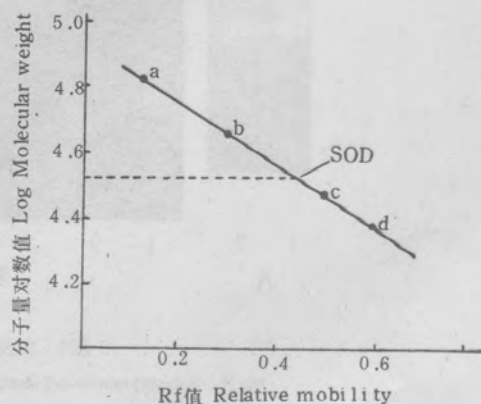


图6 白及Cu·Zn-SOD分子量的测定

Fig 6 Molecular weight determination of Cu·Zn-SOD from *Bletilla striata* by polyacrylamide gradient gel electrophoresis

a Albumin, Bovine (66 000); b Albumin, Egg (45 000);
c Carbonic anhydrase (29 000); d Tryp-siogen (24 000).

2.2.2 分子量和亚基分子量 酶分子量应用浓度为15~30%的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳,以4种标准蛋白作半对数标准曲线,测得分子量为33 KD(图6)。亚基分子量采用不连续系统 SDS-PAGE 电泳,该酶显示为一条区带,以7种标准蛋白作半对数标准曲线,测得其亚基分子量约16.4 KD(图7)。不同来源的 Cu·Zn-SOD 分子量一般在32 KD 左右^[1,5,7,11],白及 Cu·Zn-SOD 与此值相近。该酶由两个结构相同的亚基通过非共价的疏水键互相缔合。

2.2.3 等电点 纯化的白及 Cu·Zn-SOD 经管式凝胶等电聚焦电泳,呈现为一条蛋白区带(图3D)。测得其 pH 值在4.35左右(图8),重复性好。本实验未发现多条蛋白区带现象。

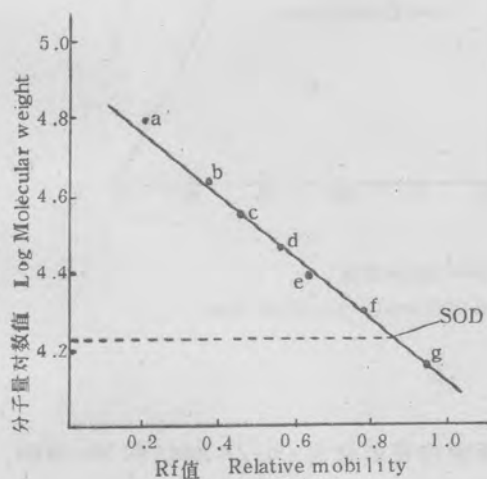


图7 白及 Cu·Zn-SOD 亚基分子量的测定

Fig 7 Molecular weight determination of the subunit of Cu·Zn-SOD from *Bletilla striata* by SDS-PAGE

- a Albumin, Bovine (66 000); b Albumin, Egg (45 000);
 c Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 000);
 d Carbonic anhydrase (29 000); e Trypsinogen (24 000);
 f Trypsin inhibitor, soybean (20 100);
 g α -Lactalbumin (14 200).

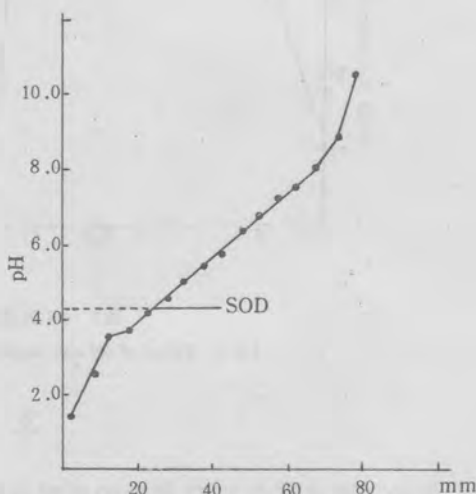


图8 白及 Cu·Zn-SOD 等电点的测定

Fig 8 Isoelectric point estimation of Cu·Zn-SOD from *Bletilla striata* by electrophoresis in range

2.2.4 酶的 pH 稳定性 向不同 pH 的柠檬酸-磷酸二氢钾-硼酸-巴比妥广泛缓冲液中,分别加入等量的纯化白及 Cu·Zn-SOD 酶液和粗酶液,25℃保温30 min,测定酶的活性(图9)。纯化酶在 pH 6.0~10.0 范围内具稳定性,而在 pH 低于6.0或高于10.0时,酶活性几乎呈线性衰减;而粗酶液稳定的 pH 范围较纯化酶稍宽。SOD 作为一种含金属酶, pH 偏高或偏低会引起金属辅基的解离和酶蛋白电荷状态的变化,而影响其清除 O₂⁻ 自由基的功能^[3]。

2.2.5 酶的热稳定 纯化的白及 Cu·Zn-SOD 在50℃范围内具有一定的稳定性,75℃保温10 min 几乎全部失活(图9),与某些植物 Cu·Zn-SOD 的热稳定性基本一致^[1,2,7]。相对而言,粗酶液在同样温度下保温10 min 尚能保留30%左右的酶活性。粗酶液的热稳定性较纯化酶好,且

有较宽的 pH 范围,可能是粗酶液内的其他成分对 SOD 起着某种“保护”作用。

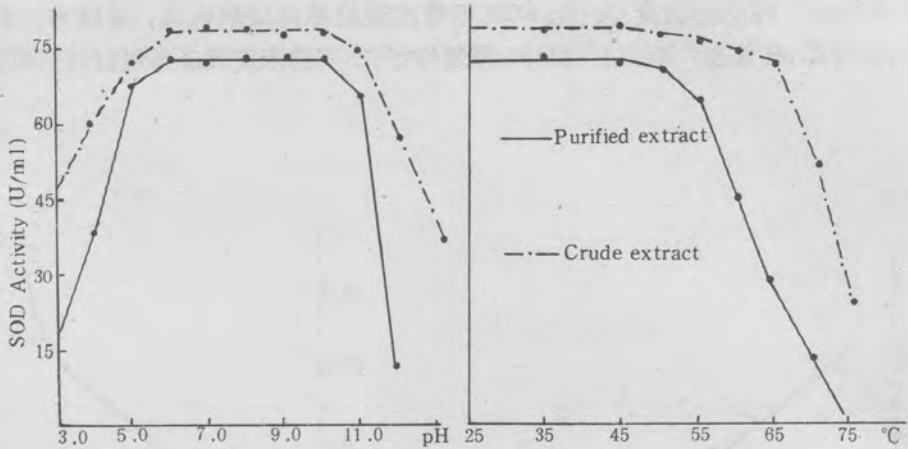


图9 pH 和温度对白及 SOD 活性的影响

Fig 9 Effect of pH and temperature on the SOD activity from *Bletilla striata*

3. 讨 论

作者在筛选富含 SOD 植物的过程中发现高等植物普遍含有 Cu·Zn-SOD 和 Mn-SOD, 且有多条同工酶谱带, 在建立了聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法分析 SOD 同工酶谱的新技术后, 又陆续在枸杞等 10 多种高等植物中发现 Fe-SOD 的存在。文献报道 3 种类型的 SOD 催化 O_2^- 发生歧化反应的功能是一致的, 生物体内一旦某类 SOD 由于相应的金属辅基缺乏而合成受阻时, 一般可以由另一类 SOD 来补偿^[15]。值得指出的是, 白及 SOD 类型单一, 且同工酶谱带仅一条; 无论是野生种还是栽培植物, 或是不同的植物器官与不同的生育期, 都只有一条 Cu·Zn-SOD 谱带(资料未列入)。植物所含 SOD 类型和同工酶谱带是否与植物的系统发育、个体发育及生态环境有关系, 在学术上有一定的意义, 有待进一步探讨。

鉴于白及只有一条 Cu·Zn-SOD 同工酶带, 且其块茎中含有丰富的白及胶, 因此采用较简便的方法即可将其 Cu·Zn-SOD 分离和纯化, 总回收率达 22.3% 的较高水平, 而且在纯化 SOD 过程中还有效地提取分离白及胶。

本文所报告的白及 SOD 的工作是在大量筛选富含 SOD 植物的基础上进行的。可以认为: 筛选 SOD 总活性和比活性都高的植物, 鉴定其 SOD 类型, 分析同工酶谱, 选取 SOD 类型及同工酶谱带单一的植物, 有利于简化 SOD 纯化流程, 提高回收率, 有利于植物 SOD 资源的开发利用。

参 考 文 献

- 1 程光宇,魏锦城,邹玉珍等. 1991: 南京师大学报(自然科学版) 14(2): 82~92.
- 2 程光宇,魏锦城,吴国荣等. 1991: 江苏植物生理学会第四届会议论文集, 43, 44, 67.
- 3 方允中,李文杰主编. 1989: 自由基与酶, 科学出版社, 北京. 118.
- 4 李文杰. 1988: 生化药物杂志 (2): 9.
- 5 李书宽,邹玉珍. 1991: 生物化学杂志 7(4): 401~406.
- 6 罗广华,王爱国. 1983: 植物生理通讯 6: 44~45.
- 7 王爱国,罗广华,邵从本等. 1983: 植物生理学报 9(1): 77~84.
- 8 吴国荣,魏锦城,程光宇等. 1991: 南京师大学报(自然科学版) 14(2): 93~101.
- 9 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.
- 10 张龙翔,张庭芳,李令媛等编著. 1981: 生化实验方法与技术, 人民教育出版社, 北京. 119~124.
- 11 邹国林,罗时文,荣俊等. 1989: 生物化学与生物物理学报 21(1): 51~57.
- 12 Bradford M M. 1976: *Anal. Biochem.* 72: 248~254.
- 13 Beers R, I Sizer. 1952: *J. Biol. Chem.* 195: 133.
- 14 Ciannopolitis C N, S K Ries. 1977: *Plant Physiol* 59: 309~314.
- 15 Kono Y, M Takahashi, K Asada. 1979: *Plant and Cell Physiol.* 20(7): 1229~1235.
- 16 Michelson A M. 1977: in A. M. Michelson *et al.* (ed.) *Superoxide and Superoxide Dismutase*, Academic Press, London. 467.
- 17 McCord J M, I Fridovich. 1969: *J. Biol. Chem.* 244: 6049~6055.
- 18 Weber K, M Osborn. 1969: *J. Biol. Chem.* 244: 4406.

(责任编辑: 罗 莹)

热烈庆祝江苏省科技期刊编辑学会建会10周年,衷心感谢各界人士对学会的关心、支持和帮助!
