

何首乌叶铜锌超氧化物歧化酶纯化及性质

程光宇¹⁾ 吴国荣¹⁾ 刘子列¹⁾ 洪志清²⁾ 魏锦城¹⁾

(¹⁾南京师范大学生命科学学院, 南京 210097; ²⁾南京市卫生防疫站, 南京 210003)

摘要 何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)叶 Cu·Zn-SOD 经硫酸铵盐析、离子交换柱层析及葡聚糖凝胶过滤等步骤, 被分离成两组 SOD 同工酶(SOD1, SOD2), 它们被纯化到均一程度。SOD1 分子量为 32.4 kD, 亚基分子量为 16.2 kD, 最适 pH 值为 5.0, 在 60℃ 和 65℃ 时的半衰期分别为 14 min 和 8 min; SOD2 分子量为 30.5 kD, 亚基分子量为 15.9 kD, 最适 pH 值为 6.0, 在 60℃ 和 65℃ 时半衰期分别为 32 min 和 16 min, 它由 274 个氨基酸残基组成, 不含 Cys、Tyr 和 Try。SOD1 和 SOD2 每 mol 酶都含有 2mol Cu 和 2 mol Zn, 它们在紫外区最大吸收波长均为 275 nm。

关键词 何首乌; 叶; Cu·Zn-SOD; 纯化; 性质

Isolation and characterization of Cu·Zn-SOD from leaves of *Polygonum multiflorum* Thunb. Cheng Guangyu¹⁾, Wu Guorong¹⁾, Liu Zilie¹⁾, Fu Zhiqing²⁾, Wei Jingcheng¹⁾, (¹⁾The College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097; ²⁾Nanjing Sanitation and Anti-Epidemic Station, Nanjing 210003), *J. Plant Resour. & Environ.* 1999, 8(3): 7~11

Two isoenzymes (SOD1 and SOD2) of Cu·Zn-SOD from the leaves of *Polygonum multiflorum* Thunb. were isolated and purified to apparent homogeneity. The relative molecular masses are about 32 400 and 30 500 for SOD1 and SOD2 respectively. SOD1 and SOD2 exhibit an optimum at pH about 5.0 and 6.0 respectively. The half-life values at 60℃ and 65℃ are respectively, 14 and 8 min for SOD1 and 32 and 16 min for SOD2. SOD2 consists of about 274 amino acid residues, from which Cys, Tyr and Try are absent. SOD1 and SOD2 contain 2 atoms of Cu and Zn per molecule of enzyme, and spectrum of the enzymes in the ultraviolet region shows the same a peak at 275 nm.

Key words *Polygonum multiflorum* Thunb.; leaf; superoxide dismutase; purification; characterization

超氧化物歧化酶(简称 SOD, EC.1.15.1.1)是一类能有效清除对生物体有害自由基的酶类, 近年来的研究表明 SOD 与自由基诱发的各种疾病的形成、发生、发展及变化密切相关, 已成为当今生物医学界研究的热点^[1]。我国药用植物资源丰富, 许多种类富含 SOD^[2]。何首乌是著名抗衰老中草药, 国内外对其有效成分进行了较多研究, 但 SOD 研究方面报道不多。本文报道何首乌叶 Cu·Zn-SOD 的纯化及性质, 为深入研究其药理作用提供理论依据。

• 江苏省教育委员会自然科学基金资助项目(1998FWXOSZ0001)

程光宇: 男, 1954 年 11 月生, 大学, 高级工程师, 江苏大自然生物工程公司副总工程师, 从事生物活性物质及保健食品研究开发工作。

收稿日期: 1999-03-15

1 材料与方 法

1.1 材 料

何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)叶取自南京师范大学生命科学学院温室。

1.2 方 法

1.2.1 何首乌叶 Cu·Zn-SOD 的纯化 采 500 g 何首乌鲜叶,剪碎后加入预冷至 4℃ 的 1 000 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8, 含 0.1 mmol/L EDTA·Na₂, 以下称 A 液),于组织捣碎机中破碎匀浆,匀浆液经 8 层纱布过滤,滤液 15 000 g 冷冻离心 20 min,弃沉淀,上清液加硫酸铵分部盐析,收集 30%~80% 饱和度的硫酸铵沉淀部分,用 A 液溶解,经 Sephadex G-25 柱脱盐,将有活性部分直接加到用 A 液平衡过的 DEAE-Sephrose 柱上,用 A 液洗至 A₂₈₀ 低于 0.02 后进行盐梯度洗脱,最先洗脱的是两个活性峰(SOD1, SOD2, 见图 1),加大盐浓度后又有两个活性峰洗脱下来。将最先洗脱的两个峰分别合并,对 A 液透析后再进行 DEAE(DE₅₂)柱层析,收集活性部分,冻干后再进行 Sephadex G-100 柱层析,用 20 mmol/L 碳酸氢铵溶液洗脱,得到洗脱体积相同的活性峰和蛋白峰,将活性峰合并,冻干后得到纯化的 SOD1 和 SOD2。

1.2.2 SOD 活性测定 采用 Stewert 和 Bewley 方法^[3]。

1.2.3 蛋白质含量测定 采用 Bradford 方法^[4]。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳及活性显示 按程光宇、魏锦城等方法^[5]。在 4%~35% 浓度梯度胶上进行。

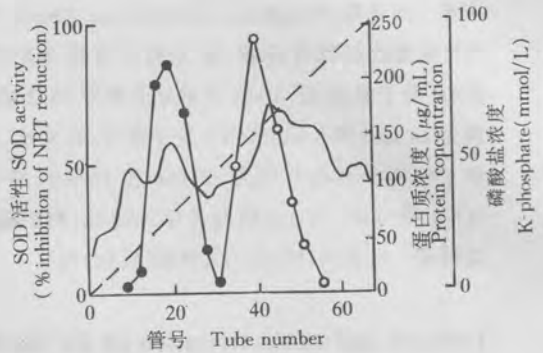
1.2.5 紫外吸收光谱测定 用岛津 UV-256 型紫外可见分光光度计测定。

1.2.6 分子量及亚基分子量测定 分子量测定用 Sephadex G-100 凝胶过滤法;亚基分子量测定用 SDS-PAGE 法,在 7.5%~20% 梯度胶上进行。

1.2.7 金属元素含量分析 在 PE-Plasma 400 电感耦合等离子体光谱仪上进行。

1.2.8 氨基酸组成分析 按 Pico·TagTM氨基酸分析系统方法进行,色氨酸按蔡武城和袁厚积的荧光法^[6],在岛津 RF-540 型荧光分光光度计上进行。

1.2.8 氨基酸组成分析 按 Pico·TagTM氨基酸分析系统方法进行,色氨酸按蔡武城和袁厚积的荧光法^[6],在岛津 RF-540 型荧光分光光度计上进行。



●—● SOD1 (peak 1); ○—○ SOD2 (peak 2);
— 蛋白质 protein; --- 磷酸盐浓度 K-phosphate

图 1 何首乌叶 SOD DEAE-Sephrose 柱层析图谱

Fig 1 Chromatography of SOD from the leaves of *Polygonum multiflorum* Thunb. on DEAE-Sephrose column

2 结 果

2.1 何首乌叶 SOD 的纯化

何首乌叶 Cu·Zn-SOD 的纯化见表 1。500 g 叶纯化后得到 2.52 mg 纯酶,酶比活性均大

于 4 000 U/mg。洗脱的 4 个活性峰经梯度胶电泳分离后,根据相对 R_f 值确定最先洗脱的峰 1 和峰 2 为 Cu·Zn-SOD(SOD1, SOD2),峰 3 和峰 4 均含有 Mn-SOD 和 Fe-SOD,但峰 3 以 Fe-SOD 为主,峰 4 以 Mn-SOD 为主(图 2)。

表 1 何首乌叶 SOD 的纯化

Tab 1 Purification of SOD from the leaves of *Polygonum multiflorum* Thunb.

纯化步骤 Step	总蛋白质 Total protein (mg)	总活性 Total activity (units)	比活性 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification (fold)	得率 Yield (%)
粗提液 Crude extract	1 670.00	160 000	95.8	1.0	100
30%~80% (NH ₄) ₂ SO ₄	630.00	100 000	158.7	1.7	63
DEAE-Sepharose SOD1	13.18	24 100	1 828.5	19.1	15
SOD2	21.00	40 200	1 914.3	20.1	25
DEAE (DE ₅₂) SOD1	3.82	12 081	3 162.6	33.0	8
SOD2	6.81	21 010	3 085.2	32.2	13
Sephadex G-100 SOD1	1.02	4 000	4 313.7	45.0	3
SOD2	1.50	9 072	6 048.0	63.1	6

2.2 何首乌叶 SOD 酶类型鉴定

2.2.1 抑制剂试验 SOD 有三种类型,根据它们对 H₂O₂ 和 KCN 的敏感性不同可将其分开。当分别加入 H₂O₂ 和 KCN 到 SOD1 和 SOD2 中后,其活性谱带均消失(图 2),说明它们对 H₂O₂ 和 KCN 均敏感,为 Cu·Zn-SOD。

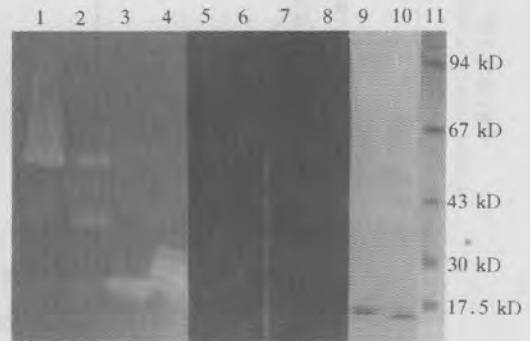
2.2.2 金属元素含量分析 金属元素分析结果表明,每 mg SOD1 酶蛋白中含 0.443% Cu 和 0.443% Zn,即每 mol SOD1 分子含有 2.3 mol Cu 和 2.1 mol Zn;每 mg SOD2 中含 0.340% Cu 和 0.425% Zn,即每 mol SOD2 分子中含有 1.7 mol Cu 和 2.1 mol Zn。它们的 Fe 和 Mn 含量均低于检测下限,说明纯化酶为 Cu·Zn-SOD。

2.3 何首乌叶 SOD 理化性质

2.3.1 紫外吸收光谱 纯酶紫外吸收光谱(图 3)表明,SOD1 和 SOD2 在紫外区最大吸收波长分别为 275.2 nm 和 275.6 nm。

2.3.2 分子量及亚基分子量 从牛血清白蛋白、卵清蛋白、胰蛋白酶及细胞色素 C 所做的

标准曲线上查得 SOD1 分子量为 32.4 kD ± 0.2 kD, SOD2 分子量为 30.5 kD ± 0.6 kD;在 7.5%~20% 的 SDS-PAGE 图谱上 SOD1 和 SOD2 均为单一区带(图 2),说明它们已被纯化到均一程度,它们的亚基分子量分别为 16.2 kD 和 15.9 kD。



1: 峰 4 peak 4; 2: 峰 3 peak 3; 3, 6, 8, 10: SOD2 (峰 2 peak 2); 4, 5, 7, 9: SOD1 (峰 1 peak 1); 5, 6: 在 2 mmol/L H₂O₂ 存在下染色 stained in the presence of 2 mmol/L H₂O₂; 7, 8: 在 2 mmol/L KCN 存在下染色 stained in the presence of 2 mmol/L KCN; 11: 标准蛋白质 standard protein

图 2 何首乌叶 SOD 的 4%~35% 的浓度梯度胶电泳(1~8)和 7.5%~20% 的 SDS-PAGE 电泳(9~11)图谱

Fig 2 4%~35% concentration gradient gels electrophoresis (1~8) and 7.5%~20% SDS-PAGE (9~11) from the leaves of *Polygonum multiflorum* Thunb.

2.3.3 pH 稳定性 取适量酶液,保温于不同 pH 值的广泛 pH 缓冲液中 20 min,测定酶活性(图 4A),SOD1 最适 pH 为 5.0, SOD2 最适 pH 为 6.0。

2.3.4 酶的热稳定性 SOD1 和 SOD2 于不同温度中保温 15 min,测定酶活性(图 4B),SOD1 在 65℃ 已大部分失活,SOD2 在 70℃ 仍较稳定。图 4C 为保温于不同温度中定时取样测定的酶活性,SOD1 和 SOD2 在 60℃ 和 65℃ 时的半衰期分别为 16 min 和 8 min 及 32 min 和 14 min。

2.3.5 氨基酸组成分析 何首乌叶 SOD2 的氨基酸组成见表 2,它由 274 个氨基酸残基组成,不含 Cys、Tyr 和 Try。

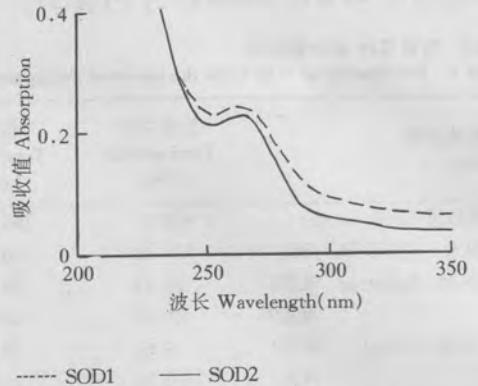


图 3 何首乌叶 SOD 的紫外吸收光谱
Fig 3 Ultraviolet absorption spectrum of SOD from the leaves of *Polygonum multiflorum* Thunb.

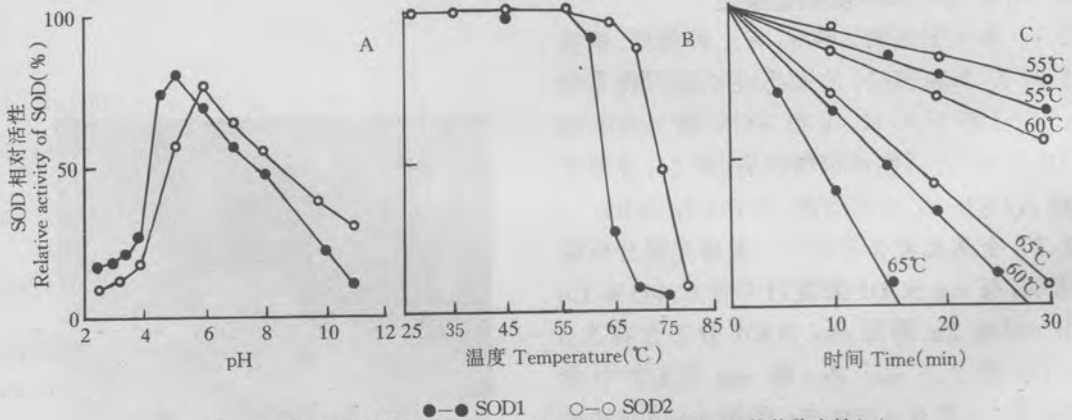


图 4 pH(A)、温度(B)对何首乌叶 SOD 活性的影响及 SOD 的热稳定性(C)
Fig 4 Effect of pH (A), temperature (B) on activity of SOD and thermal stability of SOD from the leaves of *Polygonum multiflorum* Thunb.

表 2 何首乌叶 SOD2 氨基酸组成

Tab 2 Amino acid composition of SOD2 from the leaves of *Polygonum multiflorum* Thunb.

氨基酸 Amino acid	残基数 Residues/ mol	氨基酸 Amino acid	残基数 Residues/ mol	氨基酸 Amino acid	残基数 Residues/ mol	氨基酸 Amino acid	残基数 Residues/ mol	氨基酸 Amino acid	残基数 Residues/ mol
Lys	6	Thr	22	Gly	62	Met	2	Phe	4
His	9	Ser	10	Ala	34	Iso	10	Try	0
Arg	7	Glu	18	Cys	0	Leu	24		
Asp	33	Pro	10	Val	19	Tyr	0	Total	274

3 讨 论

何首乌叶两组 Cu·Zn-SOD 同工酶(SOD1, SOD2)的纯化结果表明,它们都具有与文献报

道的 Cu·Zn-SOD 相似的理化性质,但在分子量、最适 pH 及热稳定性等方面存在一定差异,提示它们可能存在于细胞不同部位,属叶绿体型和细胞质型^[7,8],作者的研究已证实 SOD2 对 H₂O₂ 有一定抗性,存在于叶绿体内,属叶绿体型(待发表)。

本文在分离粗提液 SOD 中用梯度胶电泳取代均一胶电泳,得到了满意结果,并发现在 Mn-SOD 和 Cu·Zn-SOD 间有一条新谱带,经抑制剂试验证实为 Fe-SOD,它含量低,作者曾多次用均一胶电泳均未发现其存在。用梯度胶电泳分离 SOD 同工酶具有较高分辨率,比均一胶提高 1~2 个检测数量级^[5],能得到很清楚的谱带,在电泳中,蛋白质不受本身电荷密度影响,最终滞留于与其分子大小相当的孔径中不再迁移,可根据相对 R_f 值初步判断 SOD 三种类型,可见在分离和鉴定 SOD 同工酶中,采用梯度胶电泳比均一胶电泳有更好的应用前景。

参 考 文 献

- 1 丁克祥主编. SOD 临床研究集. 北京:原子能出版社,1992.
- 2 吴国荣,魏锦城,程光宇,等. 植物药超氧化物歧化酶活性与某些性质的研究. 南京师大学报(自然科学版),1991,14(2):93~101.
- 3 Stewert R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol*, 1980, 65: 245~248.
- 4 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254.
- 5 程光宇,魏锦城,吴国荣. SOD 的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离和酶活性显示. *植物生理学通讯*,1994,30(4):248.
- 6 蔡武城,袁厚积主编. 生物物质常用化学分析法. 北京:科学出版社,1982. 72.
- 7 Kanematsu S, Asada K. Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and harsetail. *Plant Cell Physiol*, 1990, 31(1): 99~112.
- 8 Kwiatowski J, Kaniuga Z. Isolation and characterization of cytosolic and chloroplast isoenzymes of Cu, Zn-superoxide dismutase from tomato leaves and their relationships to other Cu, Zn-superoxide dismutases. *Biochem Biophys Acta*, 1986, 874: 99~115.

(责任编辑:惠 红)

·征订启事·

《江苏农业科学》

中国自然科学核心期刊 全国优秀科技期刊 江苏省优秀期刊

《江苏农业科学》是江苏省农业科学院主办的综合性科技期刊。江苏省农业科学技术力量和农业生产水平在全国处于先进地位,每年都有大量新技术和新品种涌现,订阅《江苏农业科学》定能了解江苏农业之精华。

《江苏农业科学》刊载的文章科学性强、论证严谨,在学术上多有新的见解与发展,而且通俗易懂,

是您从事农业科研、农技推广、农业管理,跟踪农业科技,实现科学致富的良师益友。

2000 年的征订工作即将开始,欢迎订阅。本刊由南京邮政局发行,全国各地邮局(所)订阅,国内统一刊号:CN32-1158/S, 邮发代号:28-10。定价:每册 3.50 元,全年 21.00 元;邮编:210014;电话:025-4390282。