

极大螺旋藻铁型超氧化物歧化酶的纯化及性质*

陶明焯 吴国荣 陆长梅 程光宇 魏锦城

(南京师范大学生物系, 南京 210097)

提 要 极大螺旋藻 *Spirulina maxima* 藻体 SOD 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳呈现 4 条同工酶带, H_2O_2 明显抑制该酶活性, KCN 对酶活性无影响, 确认为 Fe-SOD. 经硫酸铵分部盐析、离子交换柱层析及凝胶过滤, 纯化到电泳单斑点均一程度. 纯化的 Fe-SOD 分子量为 39.3KD, 亚基分子量为 20KD. 金属元素分析表明, 每个亚基含 0.55 个 Fe 原子. 该酶在紫外区最大吸收峰值为 275.8nm. 该酶氨基酸组成与蓝、绿藻和高等植物的 Fe-SOD 相似, 但它含有较高的丙氨酸, 酸性氨基酸和碱性氨基酸比值与低等植物及原核生物相近而明显高于高等植物.

关键词 极大螺旋藻 铁型超氧化物歧化酶 纯化

分类号 Q949.2206

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, EC1.15.1.1., 简称 SOD)是生物体内普遍存在的一类能清除超氧化物阴离子自由基的金属酶, 按其结合的金属离子不同, 可分为 Fe-SOD、Mn-SOD 和 Cu·Zn-SOD. 自 1969 年 McCord 和 Fridovich 首先从牛血红细胞中分离到 Cu·Zn-SOD 以来, 相继分离出含 Fe 和含 Mn 的 SOD. Fe-SOD 广泛存在于低等植物及原核生物中, 某些高等植物中也存在此酶.

螺旋藻作为“21 世纪全球人类最理想的食物”, 已被广泛应用于食品和制药工业. 作者的工作表明, 螺旋藻不仅 SOD 总活性高, 比活性也很高. 本文报导螺旋藻 Fe-SOD 的提取纯化, 并对其部分理化性质进行了研究, 以期螺旋藻进一步的开发应用提供有价值的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料

极大螺旋藻 *Spirulina maxima* 由江苏省农科院提供. 藻种用 Zarrouk 培养基、在 30°C 、 30Wm^{-2} 光强条件下培养(12h 光照/12h 黑暗), 通入一定量空气并搅拌, 避免深浅层藻体受光照不均带来的光伤害和光饥饿现象, 同时排除过多的 O_2 , 减少因氧饱和而产生的光合抑制.

1.2 试剂

采用考马斯亮兰 G-250(Fluka)、NBT(上海前进试剂厂)、牛血清白蛋白(Serva 进口分装)、标准蛋白试剂盒(Sigma)、SDS(Serva)、DEAE-纤维素(DE_{52})(Whatman)、Sephadex G-100(Whatman), 其它试剂均为分析纯或生化试剂.

1.3 测定方法

粗酶液及纯化各步骤后的活性测定参照文献[1]和文献[2]的方法. 普通胶电泳在 10% 分

* 江苏省自然科学基金项目(1997SWX0010SK1)资助.

收稿日期: 1997-07-09; 收到修改稿日期: 1997-09-14. 陶明焯, 男, 1970 生, 助教.

离胶上进行^[2];浓度梯度胶电泳在 10% - 35% 浓度梯度胶上进行^[3]. 酶活性染色参照文献[2]方法进行. 蛋白质染色用考马斯亮兰 R-250. 可溶性蛋白质含量的测定参照文献[4]的考马斯亮兰 G-250 法. 纯酶分子量测定参照文献[5]的 Sephadex G-100 凝胶层析法; 亚基分子量测定参照文献[6]的 SDS-PAGE 的方法. 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. 紫外吸收光谱测定用岛津 UV-250 紫外可见分光光度计测定. 氨基酸组成分析按 Pico·Tag™ 氨基酸分析系统方法进行.

2 结果

2.1 极大螺旋藻 Fe-SOD 的分离纯化

将新鲜藻体用布氏漏斗抽滤, 取藻泥 70g, 按每克组织加入 4mL 预冷的 $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7.8, 含 $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA), 用超声波细胞破碎机处理 30min, 然后于 4°C , $10000\times g$ 离心 20min, 上清液即为粗酶液. 粗酶液加硫酸铵至 35% 饱和度, 冰冷冷却, 搅拌 2h 后, 于 4°C , $12000\times g$ 离心 30min, 上清液再加硫酸铵到 80% 饱和度, 4°C 静置过夜, $15000\times g$ 离心 30min, 收集沉淀. 沉淀用少量的 $2.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7.8, 含 $0.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA)溶解, 并用同样的缓冲液 4°C 动态透析 36h. 将透析液离心后加到用磷酸缓冲液平衡的 DEAE-纤维素($2\times 25\text{cm}$)柱上, 用 2.5mmol/L 的磷酸缓冲液洗脱, 洗至 A280 值低于 0.02 后, 再用 $2.5 - 100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液进行线性梯度洗脱, 分别测定 Fe-SOD 活性和蛋白质含量, 洗脱后期出现活性峰(图 1). 合并活性部分, 冷冻干燥后用少量 $20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液溶解, 再用同样的溶液 4°C 动态透析 24h, 透析液 4°C $10000\times g$, 离心 10min, 上清液上 Sephadex G-100 柱($1.5\times 80\text{cm}$), 用 $20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液进行洗脱, 并以同样条件再上一次 Sephadex G-100 柱($1.5\times 100\text{cm}$), 得到相互重叠的单一的蛋白峰和酶活性峰(图 2). 将活性部分对蒸馏水透析冷冻干燥, 得到棕色的 Fe-SOD 粉末.

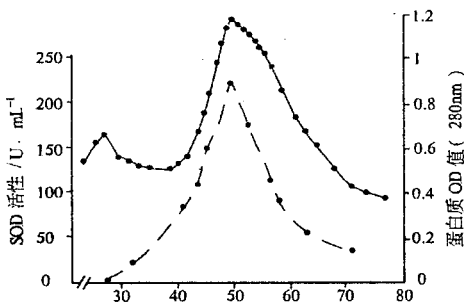


图 1 极大螺旋藻 Fe-SOD 的 DE₂ 线性浓度梯度层析图谱
——SOD 活性 ---蛋白质浓度
Fig.1 Linear gradient chromatography of Fe-SOD from *Spirulina maxima* on DE₂

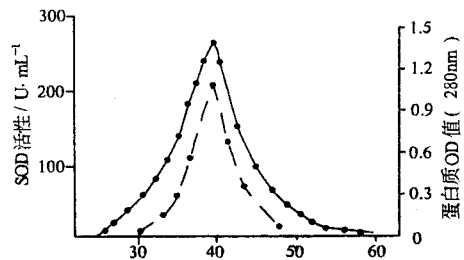


图 2 极大螺旋藻 Fe-SOD 的 Sephadex G-100 (第二次)层析图谱
—— SOD 活性 --- 蛋白质浓度
Fig.2 Chromatogram of Fe-SOD from *Spirulina maxima* on Sephadex G-100(Second)

极大螺旋藻藻体 Fe-SOD 分离纯化各步骤的结果见表 1, 70g 鲜藻体纯化后得 2.1mg Fe-SOD 蛋白, 酶比活性为 $2292.6\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 纯化 118.8 倍.

表 1 极大螺旋藻 Fe-SOD 的纯化

Tab.1 Purification of Fe-SOD from *Spirulina maxima*

纯化步骤	体积/mL	总蛋白/mg	总活性/U	比活/ $U \cdot mg^{-1}$	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	280	2580	49870	19.3	1	100
35% - 80% $(NH_4)_2SO_4$	110	1119.3	28991	25.9	1.34	58.1
DEAE-纤维素(DE_{52})	51	86.7	7286	84	4.35	14.6
Sephadex G-100(1)	48	11.9	5308	447.4	23.2	10.6
Sephadex G-100(2)	32	2.1	4814.4	2292.6	118.8	9.7

2.2 酶的类型和纯度鉴定

粗酶液在 10% - 35% 浓度聚丙烯酰胺垂直平板梯度胶电泳后,经活性染色,呈现 4 条谱带,其中 R_f 值最小的一条谱带为主活性带,分别用 $5mmol \cdot L^{-1}$ 和 $7.5mmol \cdot L^{-1}$ KCN, $25^\circ C$ 处理 10min,活性谱带不受影响,而用 $2.5mmol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 处理时,活性谱带部分抑制, $5mmol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 处理时酶活性几乎完全抑制(图 3A)。四条谱带均对 KCN 不敏感而对 H_2O_2 敏感,根据这一特性,认为它应属 Fe-SOD 类型。将纯化的酶经同样的梯度胶电泳后,将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,且与粗酶液的主活性带相对应(图 3B)。再经不连续系统 SDS-PAGE 电泳后,纯化的活性组分呈现一条蛋白谱带(图 3C),由此可知该酶已被纯化到电泳均一程度。

2.3 酶的紫外吸收光谱

用岛津 UV-250 紫外可见分光光度计测定纯酶的吸收光谱。该酶在紫外光区的最大吸收值为 275.8nm(图 4),与一些蓝、绿藻的峰值相近^[7-8]。

2.4 酶的分子量及亚基分子量

用 Sephadex G-100($1.5 \times 100cm$)凝胶层析法测定酶分子量,流速为 $12mL \cdot h^{-1}$,每管收集 2mL,从标准曲线上查得该酶分子量为 39.3KD(图 5),与大肠杆菌 B^[9] 和巨大芽胞杆菌^[10] Fe-SOD 分子量接近。酶亚基分子量为 20KD,表明该酶由两个相同亚基组成(图 6)。

2.5 酶的金属元素分析

纯酶对重蒸水透析,将透析液冷冻干燥后用于金属元素含量测定。结果表明该酶每个亚基含

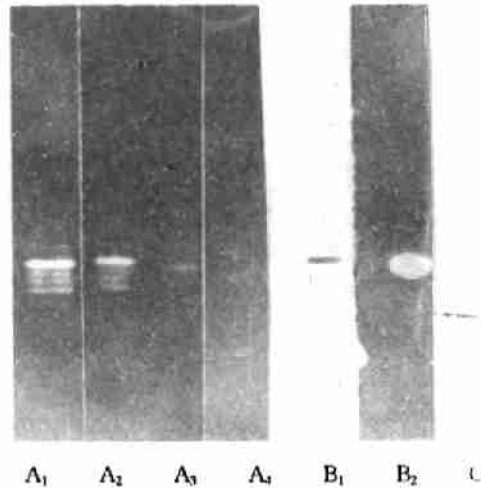


图 3 极大螺旋藻 Fe-SOD 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

A: 粗酶液及抑制剂对酶的影响(梯度胶)

A₁: 粗酶液 A₂: KCN($7.5mmol \cdot L^{-1}$)

A₃: H_2O_2 ($2.5mmol \cdot L^{-1}$)

A₄: H_2O_2 ($5.0mmol \cdot L^{-1}$)

B: 纯化后的酶(梯度胶)

B₁: 蛋白染色($0.4\mu g$ protein) B₂: 活性染色

C: 纯酶的 SDS-PAGE

Fig. 3 PAGE of Fe-SOD from *Spirulina maxima*

A: crude extract and effect of the inhibitors on activity of the SOD from *Spirulina maxima* (gradient-electrophoresis)

A₁: crude extract A₂: KCN($7.5mmol \cdot L^{-1}$)

A₃: H_2O_2 ($2.5mmol \cdot L^{-1}$) A₄: H_2O_2 ($5mmol \cdot L^{-1}$)

B: the purified SOD

B₁: protein dyeing of the purified SOD

B₂: activity dyeing of the purified SOD

C: SDS-PAGE of the purified SOD

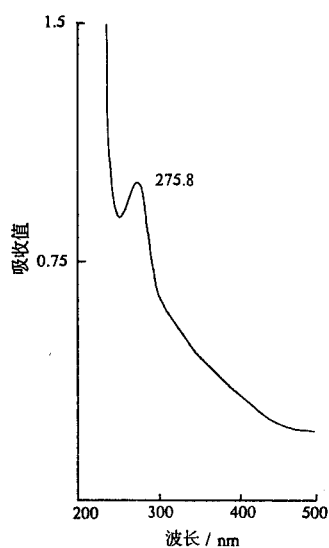


图4 极大螺旋藻 Fe-SOD 的吸收光谱(酶浓度

$0.42\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 光径 1cm)

Fig.4 Absorption spectrum of Fe-SOD from *Spirulina maxima* (with a protein concentration of $0.42\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and a light path of 1cm)

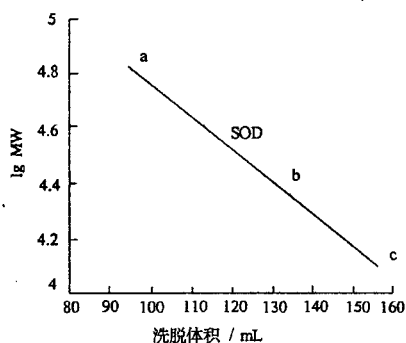


图5 极大螺旋藻 Fe-SOD 的分子量[a:牛血清蛋白(67000);b:牛胰蛋白(43000);c:细胞色素 c]

Fig.5 Molecular mass determination of Fe-SOD from *Spirulina maxima* (a: Bovine serum albumin; b: Trypsin; c: Cytochrome c)

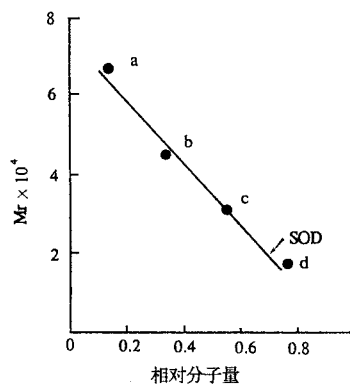


图6 极大螺旋藻 Fe-SOD 的亚基分子量

[参照蛋白:a.牛血清蛋白(67000); b.激动蛋白(43000);c.碳酸酐酶(30000); d.烟草花叶病毒蛋白(17500)]

Fig.6 Subunit molecular mass determination of Fe-SOD from *Spirulina maxima*

0.55 个 Fe 原子,与卵状假单胞菌(0.55 个 Fe 原子/亚基)^[11]一致,与大肠杆菌 B(0.5 个 Fe 原子/亚基)^[9]接近.从测定结果看,除了铁原子外,该酶还含有 0.12 个 Mn 原子/亚基.

2.6 酶的热稳定性

同一酶液在不同的温度下保温 20min 后,迅速冷却至 4℃,测定其活性(图 7).可见纯化的酶在 45℃ 以下是稳定的,高于 45℃ 时部分失活,55℃ 以上酶活性线性下降,而粗酶在 55℃ 时酶活性仍稳定.

2.7 酶对 pH 的敏感性

酶液分别加进 pH 值不同的 $30\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸-磷酸二氢钾-巴比妥缓冲液中,在 25℃ 下保温 20min,冷却至 4℃,测定酶活性(图 7).可见纯酶在 pH6-10 之间稳定,在酸性条件下几乎呈线性衰减,而粗酶稳定的 pH 范围较前者宽.

2.8 酶对脲的稳定性

脲是常见的蛋白变性剂,将酶液分别加进不同浓度的脲溶液中,25℃ 保温 30min,冷却至 4℃,测定酶活性(图 7).可见纯酶受脲影响很大,2mol·L⁻¹ 脲浓度下就开始失活,6mol·L⁻¹ 时酶已完全失活,而粗酶在 5mol·L⁻¹ 脲浓度下仍相对保持稳定.

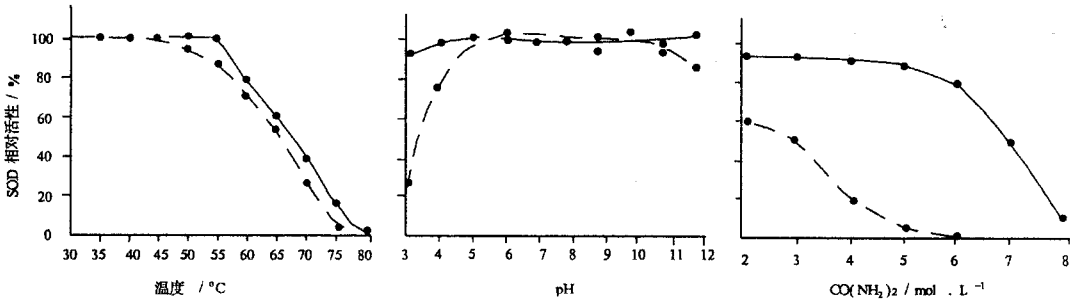


图 7 温度、pH、脲对极大螺旋藻 Fe-SOD 活性的影响 (----粗酶液;——纯酶)

Fig.7 Effect of temperature pH and urea on Fe-SOD activity from *Spirulina maxima*
----crude extract ———purified emzyme

2.9 酶的氨基酸组成

从表 2 可看出,极大螺旋藻 Fe-SOD 氨基酸组成与鲍氏织线藻、大肠杆菌等原核生物非常接近,与一些高等植物也很相近.其中天冬氨酸、谷氨酸和甘氨酸的含量较高,丙氨酸的含量最高;酪氨酸、蛋氨酸和精氨酸含量较低,半胱氨酸含量最低.在氨基酸组成中,碱性氨基酸(Arg, Lys, His)与酸性氨基酸(Glu, Asp)比值为 1:2.1,与蓝藻、绿藻及低等植物的比值接近^[7,9,12],明显高于表中所列的几种高等植物^[13,14].

表 2 极大螺旋藻 Fe-SOD 与原核生物及高等生物氨基酸组成的比较

Tab.2 A comparison of amino and composition of Fe-SOD from *Spirulina maxima* with those from other procaryotes and higher plants

氨基酸	Fe-SOD/residues·mol ⁻¹)				
	极大螺旋藻	大肠杆菌 ^[9]	鲍氏织线藻 ^[7]	枸杞 ^[13]	西红柿 ^[14]
Lys	20	20	24	16	20
His	12	12	10	5	8
Arg	7	8	3	11	8
Asp	48	44	47	42	38
Thr	20	26	20	19	18
Ser	25	20	18	32	16
Glu	32	32	32	32	28
Pro	18	18	20	28	24
Gly	45	32	29	57	20
Ala	63	52	48	29	32
Cys	2	2	2	2	/
Val	18	22	21	20	20
Met	6	0	3	3	8
Ile	16	16	5	15	16
Leu	25	30	34	29	36
Tyr	9	12	10	9	12
Phe	9	20	25	11	18
Trp	/	8	11	8	14

按照 Marchalonis 和 Weltman 方法^[15],比较极大螺旋藻与几种原核及低等植物和高等植

物 Fe-SOD 氨基酸组成间的 ΔQ 值(表 3), 发现它与原核及低等生物 Fe-SOD 间的 ΔQ 值较低, 而与一些高等植物的 Fe-SOD 间的 ΔQ 值较高, 说明原核及低等生物与高等生物 Fe-SOD 在氨基酸组成上存在差异。

表 3 Fe-SOD 的 ΔQ 值的比较
Tab.3 Comparison of ΔQ values of Fe-SOD

材料来源	ΔQ					资料来源
	极大螺旋藻	大肠杆菌	鲍氏织线藻	枸杞	西红柿	
极大螺旋藻	0					本文
大肠杆菌	45	0				文献[9]
鲍氏织线藻	81	23	0			文献[7]
枸杞	120	119	144	0		文献[13]
西红柿	149	54	48	136	0	文献[14]

3 讨论

一般认为 Fe 型、Mn 型 SOD 是原核生物酶, 而 Cu·Zn 型 SOD 是真核生物酶, 由此引出了进化方面的研究^[16]。作者曾对几种蓝藻、绿藻同工酶类型进行鉴定(资料待发表), 发现低等的原核生物蓝藻 - 螺旋藻的细胞浆中只含有 Fe-SOD, 而单细胞绿藻 - 盐藻中不仅含有 Fe-SOD, 而且其类囊体膜上还结合着 Mn-SOD, 多细胞绿藻 - 轮藻含有 Fe、Mn-SOD 和 Cu·Zn-SOD 三种类型, 说明随着藻类的结构向复杂化和多元化方向进化, 其所含的 SOD 类型也由单一的、低等的向多元的、高等的方向进化。

目前从各种生物材料中提取 Fe-SOD 的回收率都较低, 与 Cu·Zn-SOD 纯化回收率相比还有差距, 本实验纯化极大螺旋藻 Fe-SOD 回收率只有 9.7%, 其主要原因可能是藻体内所含藻兰蛋白与其 Fe-SOD 在分子量等方面相似, 因而在层析过程中必须舍弃两者相重叠的部分, 这样就增加了 Fe-SOD 的损失。作者通过增加凝胶过滤柱长度来努力改善分离效果。另外纯化过程中由于 Fe 离子易丢失而使其活性遭受破坏, 这可能与纯化过程中有关参数的选择、纯化的方法和步骤有关。因此, 有必要进一步研究纯化流程, 提高回收率。

自 1940 年 Creach 在乍得湖畔发现当地土著居民生食螺旋藻得以强身健体以来, 螺旋藻作为一个新型蛋白资源, 以其富含蛋白质、维生素、不饱和脂肪酸以及一些小分子多糖、蛋白多糖等生物活性物质而越来越受到人们重视。本实验结果显示螺旋藻每克鲜重的 SOD 活性高达 712.4U, 比所报道具有较高 SOD 活性的植物还要高数倍。粗酶液的比活性也达到 19.3U·mg⁻¹。实验结果还表明粗酶具有较高稳定性。已知螺旋藻中一些活性物质在抗肿瘤、抗辐射损伤、增强机体免疫力等方面起着重要作用, 其中 SOD 等抗氧化酶系的作用不可忽视。目前螺旋藻的生产工艺一般经过喷雾干燥来得到干粉, 虽是瞬间高温, 但螺旋藻所含丰富的活性物质容易损失。因此, 研究新的螺旋藻的加工技术, 使之能有效保存 SOD 等活性物质, 并致力于培育高 SOD 表达的螺旋藻藻体, 这些都接近一步提高螺旋藻的潜在价值。

参 考 文 献

- 1 Giannoplitis CN, SK Ries, Superoxide dismutase II: Purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedlings. *Plant Physiol*, 1977, 59:315 - 318

- 2 罗广华,王爱国等.植物 SOD 的凝胶电泳及活性显示.植物生理学通讯,1983,6:44
- 3 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显示.植物生理学通讯,1994,4:248
- 4 Bradford MM. 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 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法与技术.北京:人民教育出版社,1982.119
- 6 张承圭,王传怀等.生物化学仪器分析及技术,北京:高等教育出版社,1994.376 - 384
- 7 Asada K, Yoshikawa K, Takahashi M, *et al.* Superoxide dismutase from a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *J Biol Chem*, 1975, **250**:2801
- 8 Misra HP, Keele BB. The purification and properties of superoxide dismutase from a blue-green alga. *Biochem Biophys Acta*, 1975, **379**:418 - 418
- 9 Frederick JY, Fridovich I. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1973, **248**:4905
- 10 方允中,李文杰.自由基与酶.北京:科学出版社,1989.85
- 11 Yamakura F. Purification, crystallization and properties of iron-containing superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*. *Biochem Biophys Acta*, 1976, **422**:280
- 12 Kanematsu, S. and Asada, K. Crystalline ferric superoxide dismutase from an anaerobic green sulfur bacterium, *Chlorobium thiosulfatophilum*. *FEBS Lett*, 1978, **91**:94
- 13 程光宇,魏锦城,吴国荣.枸杞果实铁型超氧化物歧化酶的纯化及性质.植物生理学报,1994,20(7):128 - 136
- 14 Kwiatowski J, *etal.* Isolation and Characterization of iron-containing superoxide dismutase from tomato leaves, *Lycopersicon Esculentum*. *Eur J Biochem*, 1985, **146**:459 - 466
- 15 Marchalonis JJ, Weltman JK. Relatedness among proteins: A new method of estimation and its application to immunoglobulins. *Comp Biochem Physiol*, 1971, **38B**:609
- 16 陈淮扬,刘望夷.从超氧化物歧化酶的分布和结构看其分子进化.生物化学与生物物理进展,1996,23(5):408 - 413

Purification and Properties of Ironcontaining Superoxide Dismutase from *Spirulina maxima*

TAO Mingxuan WU Guorong LU Changmei CHENG Guangyu WEI Jincheng
(Biological Department, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract

The isozyme of SOD in *Spirulina maxima* with four bands by gradient electrophoresis was identified as Fe-SOD, which was purified by ammonium sulfate fractionation followed by DEAE-Cellulose and Sephadex G-100 column chromatography. The molecular weight of the enzyme is 39.3KD, and that of its subunit molecular mass is 20KD. Metal analysis showed that the Fe-SOD contains about 0.55 atom of iron per subunit. The enzyme exhibits one absorption maximum at 275.8nm. The enzyme activity could be inhibited by H₂O₂ but unaffected by KCN. The Fe-enzyme contains more alanine residues. The ratio of acid amino acid and alkaline amino acid is similar to lower plants and procaryotes, obviously higher than those of higher plants.

Key Words *Spirulina maxima*, iron-containing superoxide dismutase, purification