

## 蚕豆种子超氧化物歧化酶的纯化及性质

郭振飞 卢少云 李明启

(华南农业大学生物技术学院, 广州 510642)

**摘要** 蚕豆种子粗提液经乙醇-氯仿混合物处理、丙酮沉淀、DEAE-纤维素层析和Sephrose 6B层析, 获得比活性为2852单位  $\text{mg}^{-1}$  蛋白的超氧化物歧化酶。经聚丙烯酰胺凝胶电泳证明酶已纯化到均一程度。该酶对KCN和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 敏感, 说明它为Cu, Zn-SOD。酶分子量和亚基分子量分别为31000和14400, 说明它是由两个相同亚基组成。该酶在70℃以下和在pH5-9条件下稳定。紫外区最大吸收峰为273.5nm。

**关键词** 蚕豆; 超氧化物歧化酶

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE FROM BROAD BEAN SEEDS

Guo Zhenfei Lu Shaoyun Li Mingqi

(College of Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

**Abstract** Copper and zinc-containing superoxide dismutase from broad bean (*Vicia faba*) seeds was purified to homogeneity by the steps of crude extract, chloroform-ethanol treatment, acetone precipitation, DEAE-cellulose chromatography and Sepharose 6B chromatography. The purified enzyme had a specific activity of 2852 units  $\text{mg}^{-1}$  protein. Its activity was strongly inhibited by KCN and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Its molecular weight and subunit molecular weight were 31000 and 14400 respectively, which indicated that the enzyme was composed of two identical subunits. The enzyme was stable to heat below 70℃ and to pH at range of 5-9, and exhibited maximum ultraviolet absorption at 273.5nm.

**Key words** Broad bean; Superoxide dismutase

超氧化物歧化酶(SOD)广泛存在于需氧生物体内, 能清除机体内的超氧化物阴离子自由基。自从McCord和Fridovics<sup>[1]</sup>发现SOD功能以来, 已从动物、植物和微生物等多种生物体内分离出了SOD。近年来医学研究表明, 许多疾病的发病机理与SOD水平密切相关<sup>[2]</sup>, 因此对SOD的应用研究也取得了较大进展<sup>[3]</sup>。SOD的纯化、性质和结构研究在动物中研究较深入, 植物中多侧重于生理功能研究。豆科植物的SOD含量较高, 已从大豆<sup>[4]</sup>、莱豆叶片<sup>[5]</sup>、豌豆<sup>[6,7]</sup>和饭豆<sup>[8]</sup>等豆科植物中提纯了Cu,Zn-SOD, 本文报告蚕豆种子SOD的提纯及性质。

## 1 材料和方法

**材料** 蚕豆 (*Vicia faba*) 种子, 经表面消毒后于室温下浸泡 24h 后用于提取 SOD。

**SOD 活性测定** 参照 Giannopolitis 和 Ries<sup>[9]</sup> 方法进行。

**蛋白质含量测定** 参照 Bradford<sup>[10]</sup> 方法进行, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

**分子量与亚基分子量测定** 全酶分子量采用凝胶过滤法测定, 亚基分子量采用不连续系统 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 分离胶浓度为 10%。标准蛋白由上海丽珠东风生物技术有限公司生产。

**紫外吸收光谱** 用 Beckman DU-7 型分光光度计测定 220-300nm 的吸收。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶的提纯

取充分吸胀的蚕豆种子, 加入 2 倍体积的 50mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.8), 于组织捣碎机上捣碎。匀浆液经尼龙布过滤, 滤液于 12000 × g 离心 20min, 上清液即为粗酶液。向粗酶液加入 0.25 倍体积乙醇和 0.15 倍体积氯仿混合液 (-20℃), 搅拌 10min, 同前离心, 弃沉淀。上清液加入 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2g/100ml) 离心弃沉淀。向上清液加入 0.5 倍体积的丙酮 (-20℃), 离心弃沉淀; 再向上清液加入 1 倍体积丙酮, 同前离心, 收集沉淀。用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.8) 溶解, 离心, 除去不溶性杂质。上清液经 Sephadex G-25 柱脱盐后, 上 DEAE-纤维素柱, 以含 0-0.6mol/L KCl 的 10mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.8) 进行线性梯度洗脱, 检测 SOD 活性。在洗脱过程中只发现一个酶活性峰 (图 1), 与饭豆种子洗脱出两个 SOD 活性峰<sup>[9]</sup> 不同。收集 SOD 活性高的部分, 用 PEG 将酶液浓缩后, 上 Sepharose 6B 柱, 以 10mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.8) 洗脱, 只出现一个活性峰 (图 2)。酶比活性达 2852U mg<sup>-1</sup> 蛋白。经过以上几个步骤, 酶被纯化了 844 倍, 得率 19.1% (表 1)。

### 2.2 酶纯度鉴定

纯化的酶液以 PEG 浓缩至 1mg ml<sup>-1</sup>, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行染色, 出现一条蛋白带 (图 3)。结果说明该酶已被纯化到电泳纯。

### 2.3 对抑制剂敏感性

根据对金属的依赖性不同, 可将 SOD 同工酶分成三种类型: Cu, Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD。Cu, Zn-SOD 能被 KCN 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制, 但不受乙醇-氯仿影响; Mn-SOD 则与之相

表 1 蚕豆 SOD 的纯化

Table 1 Purification of SOD from broad bean seeds

纯化步骤 Purification step	总蛋白 (mg) Total protein	总活性 (U) Total activity	比活性 Specific activity (U mg <sup>-1</sup> protein)	产率 Yield (%)
粗酶液 Crude extract	19880	67188	3.38	100
氯仿-乙醇处理 Chloroform-ethanol	1834.3	65518	35.7	97.5
丙酮处理 Aceton precipitation	155.3	27450	176.8	40.9
DEAE-纤维素 DEAE-cellulose	16.4	13536	825.4	20.1
Sepharose 6B	4.5	12836	2852.4	19.1

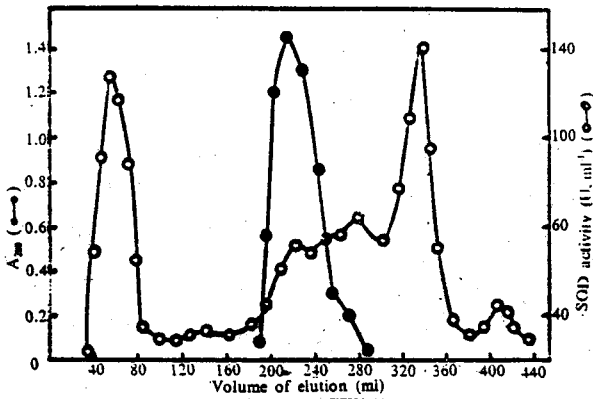


图 1 蚕豆 SOD 的 DEAE-纤维素柱层析洗脱图

Fig. 1 DEAE-cellulose column elution pattern of SOD from broad bean seeds

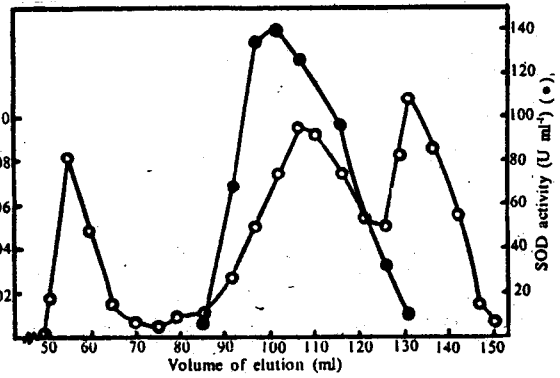


图 2 蚕豆 SOD 的 Sepharose 6B 柱层析图

Fig. 2 Sepharose 6B column chromatography of SOD from broad bean seeds

反; 而 Fe-SOD 则受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制, 不受 KCN 和乙醇-氯仿影响, 可根据这种特性区分 SOD 同工酶类型<sup>[4]</sup>。纯化的蚕豆 SOD 活性分别受 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 3mmol/L KCN 抑制 91% 和 90%, 但在提纯过程中不受乙醇-氯仿混合液的影响。因此, 本文提纯的蚕豆 SOD 属 Cu,Zn-SOD。

### 2.4 分子量和亚基分子量

采用不连续系统 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蚕豆 SOD 表现为单一条带。根据其迁移率和标准蛋白的迁移率, 计算出亚基分子量为 14400(图 4)。



图 3 纯化的蚕豆 SOD 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图  
Fig. 3 PAGE of purified SOD from broad bean seeds

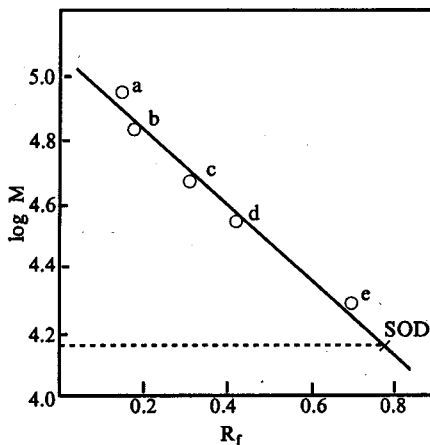


图 4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蚕豆 SOD 分子量

Fig. 4 Determination of the molecular weight of SOD from broad bean seeds by SDS-PAGE

Reference proteins: a. Phosphorylase b (94000); b. Albumin (67000); c. Actin (43000); d. Carbonic anhydrase (30000); e. TMV coat protein (17500)

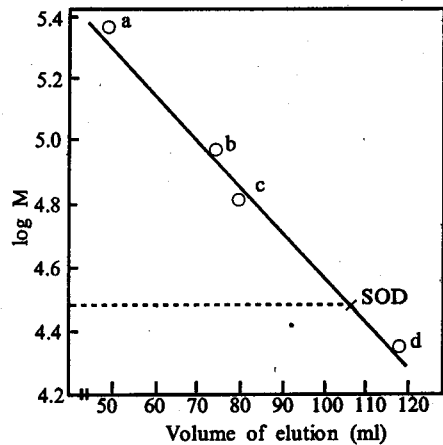


图 5 用 Sepharose 6B 凝胶柱层析测定蚕豆 SOD 分子量

Fig. 5 Determination of the molecular weight of SOD from broad bean seeds by Sepharose 6B column chromatography

Reference proteins: a. Catalase (240000); b. Phosphatase, alkaline (100000); c. BSA (67000); d. Trypsin (23300)

将纯化的酶液浓缩后,上 Sepharose 6B 柱,根据其洗脱体积,从标准蛋白(过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、牛血清蛋白和胰蛋白酶)作的标准曲线上查得该酶分子量为 31000(图 5)。结果说明,蚕豆 SOD 是由两个相同亚基组成的。据报道,不同来源的 Cu,Zn-SOD,酶分子量均在 32000 左右,其亚基分子量在 16000 左右<sup>[5,8,11,12,14]</sup>,其酶分子是由两个相同亚基组成。本文结果与前人的研究结果是一致的。程光宇等<sup>[8]</sup>从饭豆(*Vigna umlellata*)种子分离出亚基分子量分别为 15900 和 17000 的 Cu,Zn-SOD 同工酶,我们在蚕豆种子未发现这种现象。

2.5 酶稳定性

将纯酶在不同温度的水浴中保温 10min, 迅速冷却, 测定酶活性。结果表明, 蚕豆 SOD 在 70℃ 条件下尚保持 70% 活性, 50℃ 以下保持近 90% 活性(图 6)。SOD 是一种对热稳定的蛋白质, 动物血液的 Cu,Zn-SOD 一般在 75℃ 以下不失活<sup>[3,14]</sup>; 从植物组织提取的 SOD 的热稳定性则表现出一些差异。例如, 饭豆 SOD 在 75℃ 以下不失活<sup>[8]</sup>; 我们从豌豆种子提取的 Cu,Zn-SOD 在 0-70℃ 范围内稳定(待发表)。大豆 Cu,Zn-SOD 对热也稳定, 60℃ 时很少失活<sup>[4]</sup>, 而枸杞果实 Cu,Zn-SOD 60℃ 时几乎完全失活<sup>[15]</sup>。

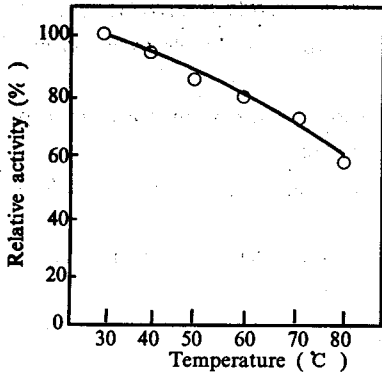


图 6 温度对蚕豆 SOD 活性的影响  
Fig. 6 Effect of temperature on the activity of SOD from broad bean seeds

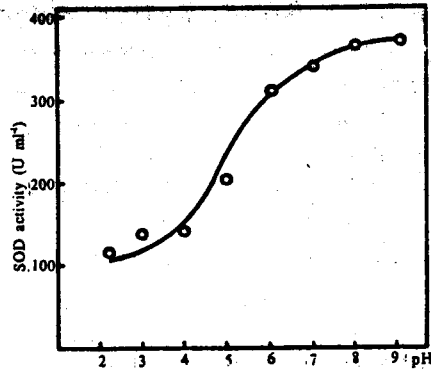


图 7 pH 对蚕豆 SOD 活性的影响  
Fig. 7 Effect of pH on the activity of SOD from broad bean seeds

吸取 0.1ml 的纯酶加入到 0.4ml 的 0.2mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸缓冲液 (pH2.2-9.0) 中, 24h 后测定活性。该酶在 pH9 活性最大, 随 pH 下降活性降低, 小于 pH5 时活性急剧降低(图 7)。pH6 时尚能保持最大活性的 84%, pH5 和 pH2.2 时仅表现最大活性的 55% 和 31%。结果说明, 蚕豆 SOD 在偏碱性条件下较稳定。我们发现豌豆种子 SOD 也具有类似性质(待发表)。

2.6 紫外吸收光谱

蚕豆 SOD 在紫外光区的吸收峰在 273.5nm(图 8)。其它动、植物来源的 Cu,Zn-SOD 的紫外吸收峰均在 260nm 附近<sup>[8,11-14]</sup>, 这是因为 Cu,Zn-SOD 分子中

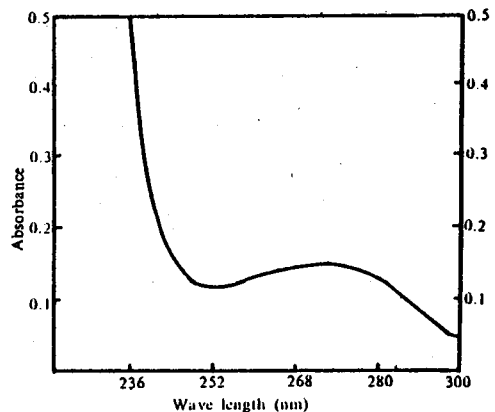


图 8 蚕豆 SOD 的紫外吸收曲线  
Fig. 8 Ultraviolet absorption spectrum of SOD from broad bean seeds

酪氨酸和色氨酸残基含量低,使得吸收峰低于 280 nm. 该结果进一步证明所提纯的酶属 Cu,Zn-SOD.

### 参考文献

- 1 McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem*, 1969, 244:6049-6055
- 2 方允中, 李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989, 193-231
- 3 袁勤生. SOD 在医药、食品和日化工业上的应用. *中国生化药物杂志*, 1994, 15:289-294
- 4 王爱国, 罗广华, 邵从本. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. *植物生理学报*, 1983, 9:77-84
- 5 Kono Y, Takahashi M, Asada K. Superoxide dismutase from kidney bean leaves. *Plant Cell Physiol*, 1979, 20: 1229-1235
- 6 Sawada Y, Ohyama T, Yamazaki I. Preparation and physicochemical properties of green pea superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 268:305-312
- 7 Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide Dismutase. II. purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant Physiol*, 1977, 59:315-318
- 8 程光宇, 吴国荣, 魏锦城等. 饭豆铜锌超氧化物歧化酶的纯化及性质. *南京师大学报(自然科学版)*, 1994, 17:121-126
- 9 Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309-314
- 10 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
- 11 邹国林, 罗时文, 荣俊等. 小白菜叶绿体铜锌超氧化物歧化酶的纯化和某些性质研究. *生物化学与生物物理学报*, 1989, 21:51-57
- 12 王转花, 张政, 林汝法等. 苦荞叶片超氧化物歧化酶的纯化及性质研究. *生物化学杂志*, 1994, 10:539-543
- 13 袁勤生. 超氧化物歧化酶的研究进展. *中国药学杂志*, 1989, 24:387-391
- 14 王亦根, 程光宇, 吴国荣等. 牛血红细胞铜锌超氧化物歧化酶的纯化及性质. *南京师大学报(自然科学版)*, 1994, 17: 108-112
- 15 程光宇, 魏锦城, 邹玉珍等. 枸杞果实铜锌超氧化物歧化酶的纯化及其性质的研究. *南京师大学报(自然科学版)*, 1991, (2):82-92