

花生种子铜锌超氧化物歧化酶的 纯化及理化性质研究

程光宇^{1,4}, 高兴¹, 洪志清², 王晓炜³, 陆长梅¹, 吴国荣^{1,*}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210097; 2. 南京市疾病预防控制中心, 江苏南京 210003;

3. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏南京 210097;

4. 江苏吴中大自然生物工程有限责任公司, 江苏南京 210097)

摘要:花生种子铜锌超氧化物歧化酶经氯仿-乙醇处理、硫酸铵盐析、凝胶过滤和离子交换柱层析等步骤被分离纯化到均一程度。该酶相对分子量为 31500Da, 由两个相同亚基组成, 亚基分子量为 16010Da, 它在紫外区最大吸收波长为 253nm, 等电点为 4.2, 每摩尔酶含 2 个原子 Cu 和 2 个原子 Zn, 2mmol/L H_2O_2 和 0.2mmol/L KCN 能完全抑制其活性, 该酶由 303 个氨基酸残基组成, 含有较高的丝氨酸和缬氨酸, 不含色氨酸和半胱氨酸。纯化后的 SOD 比活性为 5029U/mg, 活力回收率为 34%。

关键词:花生, 种子, 超氧化物歧化酶(SOD), 纯化, 性质

Abstract: CuZn-Superoxide dismutase from peanut seeds were purified to homogeneity by the methods of chloroform-ethanol treatment, ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-100 gel filtration and ion exchange chromatography. The enzyme had a molecular weight of 31500Da and was composed of two equal subunits which was 16010Da. The enzyme exhibited one maximum absorption at 253nm, and the isoelectric point of CuZn-SOD was 4.2. The enzyme contained about 2 atoms of copper and 2 atoms of zinc per mole of enzyme, and its activity could be inhibited by KCN and H_2O_2 . Peanut CuZn-SOD consisted of 303 amino acid residues; it showed distinctly more valine, serine and less tryptophan and cysteine in amino acid composition. Purified SOD had a specific activity of 5029 U/mg and the yield of total activity was about 34%.

Key words: peanut; seed; SOD; purification; property

中图分类号: TS201.2⁵ 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)02-0082-04

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, 简称 SOD, EC 1.15.1.1) 是广泛存在于动植物体内的一类金属酶, 具有催化超氧自由基歧化反应的能力^[1]。近年来研究表明, SOD 在预防和治疗由自由基引发的一系列疾病, 如肿瘤、自身免疫性疾病、炎症及辐射损伤

等方面起到了很重要的作用^[2]。值得注意的是, 它作为抗氧化和预防衰老的功能因子在食品和保健食品领域正得到广泛应用^[3]。植物种子中富含 SOD, 人们已经从豌豆、黑加仑、莲、紫草等种子中纯化了 SOD^[4-7], 花生种子即花生仁, 不仅是最常见食品, 也是丰富的 SOD 资源^[8], 但对于花生种子 SOD 的分离纯化及理化性质等方面的研究, 国内外尚未见详细报道。本文报道花生种子铜锌超氧化物歧化酶的分离纯化及性质, 旨在为花生种子 SOD 资源的开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 种子 品种为徐州 68-4, 来源于徐州农科院, 经表面消毒后于 25℃吸胀 24h 后备用; Sephadex G-100 (Pharmacia)、DEAE (DE-52) (Whatman)、BSA、卵清蛋白、碳酸酐酶、胰蛋白酶抑制剂 Sigma 公司; SDS-PAGE 低分子量标准蛋白 上海东风生化试剂厂; NBT 国药集团化学试剂有限公司; 其余试剂 为国产分析纯或生化试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 SOD 活力测定 按 Stewert 和 Bewley^[9]的 NBT 光化还原法进行。测定体系中含 13mmol/L 甲硫氨酸, 75 μ mol/L NBT, 2 μ mol/L 核黄素, 100nmol/L EDTA, 50mmol/L pH7.8 磷酸缓冲液和适量的酶液, 以抑制 NBT 光化还原 50%时的酶量为一个 SOD 活力单位。

1.2.2 蛋白质含量测定 按 Bradford^[10]方法进行, 以 BSA (含量大于 99%) 为标准蛋白, 测定样品蛋白质含量。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 酶的 PAGE 和活性染色按罗广华等^[11]方法, 在 10%的分离胶上进行, 蛋白染色采用考马斯亮兰 R-250。

1.2.4 分子量及亚基分子量的测定 分子量测定用 Sephadex G-100 凝胶过滤法, 以 BSA (66.2kDa), 卵清蛋白 (45kDa)、碳酸酐酶 (36kDa) 和胰蛋白酶抑制

收稿日期: 2006-05-26 *通讯联系人

作者简介: 程光宇(1954-), 男, 高级实验师, 硕士, 主要从事生物活性物质的研究与开发工作。

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(1998SWXOSZ001)。

表1 花生种子 CuZn-SOD 的纯化

纯化步骤	总蛋白(mg)	总活性(units)	比活性(U/mg)	纯化倍数	得率(%)
粗酶液	2262.56	17467.5	7.7	1.0	100.0
氯仿-乙醇液处理	1245.89	17125.0	13.4	1.8	98.0
30%~90%(NH ₄) ₂ SO ₄	125.21	15584.0	124.5	16.2	89.2
Sephadex G-100	17.10	13855.2	810.2	105.2	79.3
DEAE(DE-52)	1.93	7343.8	3811.0	494.9	42.0
SephadexG-100	1.17	5884.0	5029.0	653.1	33.7

剂(20.1 kDa)制作标准曲线,计算酶的分子量;亚基分子量测定在 7.5%~20%的 SDS-PAGE 上进行。

1.2.5 等电聚焦电泳及金属元素含量测定 将纯酶对重蒸水透析 24h(期间更换 4 次重蒸水)后冷冻干燥。按袁玉荪等^[12]方法测定酶的等电点;在 PE-plasma400 电感耦合等离子体上测定酶的金属元素含量。

1.2.6 氨基酸组成分析 将纯酶透析冻干后,按 Pico-TagTM 氨基酸分析系统的方法测定酶的氨基酸组成,色氨酸测定采用蔡武城等^[13]方法,在岛津 RF-540 型荧光分光光度计上进行。

2 结果与分析

2.1 酶的纯化

吸胀的花生种子按 1:2(w/v)的比例加入 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.8,含 1mmol/L 的 EDTA),于组织捣碎机中匀浆,日立离心机 10000×g 冷冻离心 10min,弃沉淀,上清液加入 0.25 倍体积的氯仿-乙醇液(v/v=2:3),立即充分混合均匀,离心后留上清液,加入硫酸铵至 30%饱和度,同上条件离心后弃沉淀,上清液再加硫酸铵至 90%的饱和度,15000×g 冷冻离心 15min 后保留沉淀,将沉淀溶解,透析冻干。用 2mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.8,含 0.1mmol/L 的 EDTA,以下称 A 液)溶解冻干物,进行 Sephadex G-100 柱层析(2×90cm),用 A 液洗脱,收集 SOD 活性部分,加到用 A 液平衡的 DEAE 柱上,洗至 A₂₈₀ 低于 0.02 后,进行 2~60mmol/L 磷酸缓冲液梯度洗脱,检测酶活性和蛋白含量,SOD 约在 40mmol/L 的浓度时被洗脱下来。将 SOD 活性峰合并,透析后冷冻干燥,用 A 液溶解后再进行 Sephadex G-100 柱层析,合并活性峰,冷冻干燥后就得到了 SOD 的纯酶。酶的 DEAE 柱层析分离及纯化步骤见图 1 和表 1。

2.2 花生 SOD 的纯度鉴定

图 2 为花生 SOD 电泳图谱。纯化的 SOD 在 PAGE 中的活性带和蛋白带均为一条,与粗酶液中 CuZn-SOD 的第一条谱带对应,在等电聚焦电泳和 SDS-PAGE 中也均为单一的谱带,说明该酶已被纯化到电泳纯程度。

2.3 酶的理化性质

2.3.1 紫外吸收光谱 在岛津 UV-256 型紫外可见分光光度计上测定酶的紫外吸收光谱,该酶在紫外区

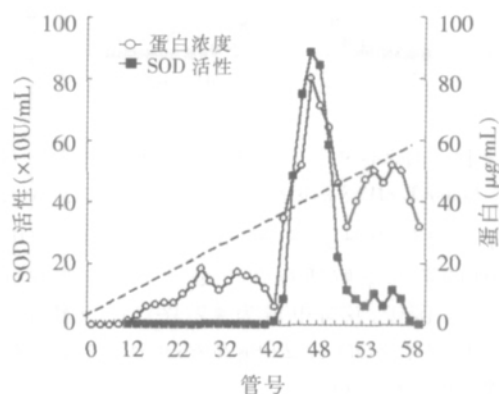


图1 花生种子 CuZn-SOD 的 DEAE 柱层析(2×12cm)分离(---:2~60mmol/L 的磷酸缓冲液梯度洗脱,流速为 8.0mL/h,每管收集 3.5mL)

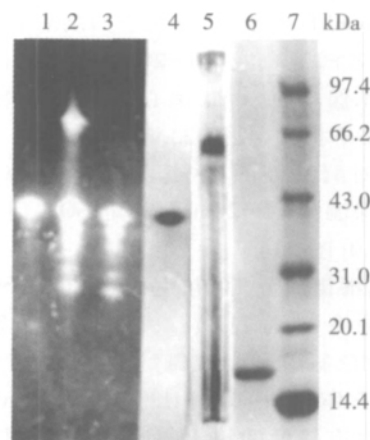


图2 花生 SOD 的电泳图谱(1~4:10%PAGE;5:等电聚焦电泳;6~7:7.5%~20% SDS-PAGE。1,4,5,6:纯化的 CuZn-SOD;2:粗酶液;3:同 2,但经氯仿-乙醇液处理;7:标准蛋白质。1~3 为活性染色;4~7 为蛋白染色)。

的吸收最大值为 253nm。花生种子 CuZn-SOD 氨基酸组成中不含色氨酸,酪氨酸含量仅为 2,故在 280nm 处无明显吸收,与文献报道的 CuZn-SOD 的光谱特性一致。

2.3.2 分子量及亚基分子量 用 Sephadex G-100 凝胶过滤法测定酶分子量,测得 SOD 的洗脱体积为 46mL,从标准曲线上查得该酶的分子量为 31500Da。它在凝胶柱层析中的活性峰和蛋白峰为相互重叠的单一峰(图 4)。在 7.5%~20%的 SDS-PAGE 中 SOD

呈现一条区带(图2),其亚基分子量为16010Da,说明花生CuZn-SOD是由两个相同的亚基组成。

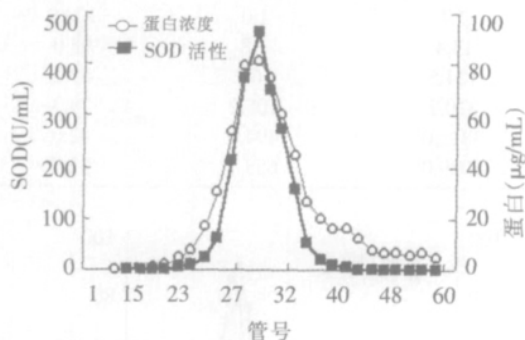


图4 花生种子CuZn-SOD的Sephadex G-100柱层析(1.5×60cm,以2mmol/L pH7.8的磷酸缓冲液洗脱,流速为16mL/h)

2.3.3 等电聚焦电泳及金属元素含量分析 SOD在pH3.5~10的两性电解质存在下进行等电聚焦电泳分析,呈现单一区带,其等电点为4.2(图2)。纯酶金属元素含量分析显示SOD含2.08g铜/mol和2.18g锌/mol,表明纯酶为CuZn-SOD。

2.3.4 抑制剂对酶活性的影响 在测定体系中加入不同浓度的KCN和H₂O₂及酶液后,于25℃避光保温15min,测定酶活性,当KCN达0.2mmol/L浓度和H₂O₂达2mmol/L浓度时,能完全抑制酶的活力。将酶液与氯仿-乙醇混合液(v/v=2/3)按1/0.25(体积比)混合后于25℃保温60min,离心后测定上清液酶活力,其活力几乎不损失(见表2)。

2.3.5 pH对酶活性的影响 取适量酶液于广泛pH缓冲液中保温(25℃)20min,测定SOD活性,该酶最适pH为6.0(图5)。

2.3.6 氨基酸组成分析 花生种子CuZn-SOD氨基酸组成测定结果表明(表3),该酶由303个氨基酸残基组成,不含色氨酸和半胱氨酸,与来源于豌豆、水稻和紫草种子CuZn-SOD相比^[7],花生CuZn-SOD氨基酸组成中含有较低的赖氨酸、苏氨酸和甘氨酸,而丝氨酸、缬氨酸含量较高。

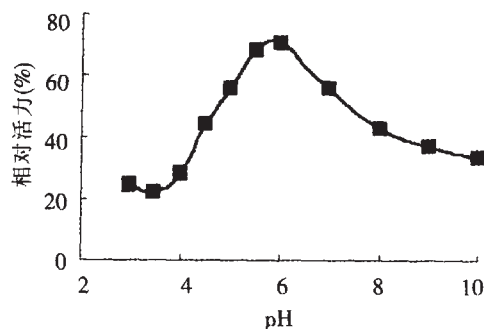


图5 pH对花生种子CuZn-SOD活性的影响

3 讨论

本文从50g花生种子中得到高比活性纯酶为1.17mg,酶回收率为34%,高于文献中有关植物种子报道值^[5,14,15],说明花生种子富含SOD,是制备SOD的好材料。我们研究表明,花生SOD含量可达930~1660U/g fw,是植物中SOD活性较高的一个类群^[16,17]。SOD有Fe-SOD、Mn-SOD和CuZn-SOD三种类型,它们都能有效清除自由基。在花生种子中R_f值最小的一条谱带,经氯仿-乙醇液处理后消失,为Mn-SOD,其余六条为CuZn-SOD。SOD是清除氧自由基的关键酶,细胞内其它组分如Cyt_f、GSH、质体醌、维生素C等也有清除自由基的作用,它们相互补充,共同构成了体内活性氧防御体系。花生含有较高的SOD活性,在食用中如能加以妥善保护,将可增强机体清除自由基的能力,防止自由基对核酸、蛋白质等生物大分子结构的损伤,保护细胞膜系统功能的完整性,从而延缓衰老进程,难怪民间将花生称为“长生果、长寿果”,的确有一定道理。

花生作为油料作物,种子油脂含量高达50%,蛋白质含量近30%^[18],增加了SOD的分离和纯化的难度,在纯化工艺中采用了氯仿-乙醇液处理步骤,可除去粗提液中45%的杂蛋白,而SOD活性几乎不丢失,有利于SOD的纯化,同时,花生中的Mn-SOD经氯仿-乙醇液处理后失活,使CuZn-SOD的纯化变得相对简单。纯化后的花生SOD,在SDS-PAGE和等电

表2 几种抑制剂对花生种子CuZn-SOD活性的影响

	CK	KCN(mmol/L)			H ₂ O ₂ (mmol/L)			氯仿-乙醇
	0	0.05	0.1	0.2	0.05	0.25	2	
相对酶活性(%)	100	29.6	14.8	0	59.3	33.3	0	95

表3 花生种子CuZn-SOD氨基酸组成

氨基酸	残基数	氨基酸	残基数	氨基酸	残基数
赖氨酸	8	苏氨酸	16	甘氨酸	49
组氨酸	13	丝氨酸	33	丙氨酸	21
苯丙氨酸	7	谷氨酸	26	蛋氨酸	2
天冬氨酸	33	脯氨酸	20	缬氨酸	38
半胱氨酸	0	亮氨酸	20	精氨酸	7
异亮氨酸	8	酪氨酸	2	色氨酸	0

聚焦电泳中为单一区带, 在凝胶柱层析中为单一对称峰, 说明已纯化到均一程度, 可见该 SOD 纯化工艺是可行的。

我国是世界上第二大花生生产国, 全国各地广泛栽培, 不仅资源丰富, 且价格低廉, 对花生种子 SOD 性质的深入研究, 将有助于花生 SOD 资源的深度开发和利用。

参考文献:

- [1] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) [J]. J Biol Chem, 1969, 244(22): 6049~6055.
- [2] 陈华东, 丁克祥. SOD 与肿瘤的关系及其防治研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 1996, 23(8): 587~591.
- [3] 崔慧斐, 张天民. 超氧化物歧化酶在食品和化妆品中的应用及其发酵法生产进展[J]. 药物生物技术, 2000, 7(3): 187~189.
- [4] Y Swawada, T Ohyama, I Yamazaki. Preparation and physicochemical properties of green pea Superoxide dismutase[J]. Biochem Biophys Acta, 1972, 268: 305~312.
- [5] 侯丽华, 明霞. 纯化黑加仑种子超氧化物歧化酶(SOD)的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2004, 35(2): 133~134.
- [6] 黄上志, 汤学军, 芦春斌, 等. 莲子超氧化物歧化酶的特性分析[J]. 植物生理学报, 2000, 26(6): 492~496.
- [7] Nanir I A, Haddad, Qigsheng Yuan. Purification and some properties of Cu, Zn superoxide dismutase from Radix lethospermi seed, kind of Chainse traditional medicine[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 818: 123~131.
- [8] 程光宇, 吴国荣, 陆长梅, 等. 花生种子 SOD 活性及热稳定性研究[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(2): 41~44.
- [9] Stewert RC, Bewley JD. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. Plant Physiol, 1980, 65(2): 245~248.
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248~254.
- [11] 罗广华, 王爱国. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性显示[J]. 植物生理学通讯, 1983(6): 44~45.
- [12] 袁玉荪, 朱婉华, 陈均辉编. 生物化学实验[M]. 北京: 人民教育出版社, 1980. 68~71.
- [13] 蔡武城, 袁厚积主编. 生物物质常用化学分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1982. 72.
- [14] 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[J]. 南京师大学报(自然科学版), 1994, 17(2): 121~126.
- [15] 郭振飞, 卢少云, 李明后. 碗豆种子超氧化物歧化酶的纯化及性质[J]. 华南农业大学学报, 1996, 17(2): 83~87.
- [16] 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[J]. 南京师大学报(自然科学版), 1991, 14(2): 93~101.
- [17] 黄长干, 王宗德, 魏建华, 等. 高含量 SOD 植物的筛选[J]. 江西农业大学学报, 1996, 18(4): 399~402.
- [18] 曹凯光. 花生资源的综合开发利用[J]. 江西食品工业, 2002(1): 15~17.
- [8] Boume M C. Texture profile analysis[J]. Food Technol, 1978, 32(7): 62~66, 72.
- [9] Lanier T C, Hart K, Martin R E. A manual of standard methods for measuring and specifying the properties of surimi [J]. Washington, DC: National Fisheries Institute. 1991.
- [10] 万建荣, 洪玉菁, 奚印慈, 等. 水产食品化学分析手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1993, 154~172.
- [11] 赵仁勇, 毕艳兰, 朱永义. 糙米及其制品中植酸含量的测定方法[J]. 粮食与饲料工业, 2002(1): 44~45.
- [12] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 中国农业大学出版社, 1996, 52~54, 57~58.
- [13] Benjakul S, Seymour T S, Morrissey M T, An H. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage[J]. Journal of Food Science, 1997, 62: 729~733.
- [14] 今野久仁彦, 田泽明子, 高桥真之. 鱼类肌球蛋白的加热和冷冻变性机理. 1999 年中日合作淡水渔业资源加工利用技术报告文集.
- [15] 汪之和, 王槌, 苏德福. 冻结速率和冻藏温度对鲢肉蛋白质冷冻变性的影响[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 564~569.

(上接第 81 页)

学变化及其影响因素[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 153~157.

[2] 曾名勇, 黄海, 李八方. 鲮肌肉蛋白质生化特性在冻藏过程中的变化[J]. 水产学报, 2003, 27(5): 480~485.

[3] 曾名勇, 黄海, 李八方. 不同冻藏温度对鲮鱼肌肉蛋白质生化特性的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(4): 525~530.

[4] Benjakul S, Visessanguan W, Thongkaew C, et al. Effect of frozen storage on chemical and gel-forming properties of fish commonly used for surimi production in Thailand [J]. Food Hydrocolloid, 2005, 19: 197~207.

[5] Suvarich V, Jahnncke M L, Marshall D L. Changes in selected chemical quality characteristics of channel catfish frame mince during chill and frozen storage[J]. J of Food Sci, 2000, 65(1): 24~29.

[6] Lian P Z, Lee C M, Hufnagel L. Physicochemical properties of frozen Red Hake mince as affected by cryoprotective ingredients [J]. J of Food Sci, 2000, 65(7): 1117~1123.

[7] Fukuda Y, Kakehata K I, Arai K I. Denaturation of myofibrillar protein in deep-sea fish by freezing and storage [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1981, 47(5): 663~672.