

牛血 Cu/Zn-SOD 的热稳定性^{*}

申煜^① 魏建民^② 常弘^{①**}

(① 中山大学生命科学学院 广州 510275; ② 内蒙古农业大学生物工程学院 呼和浩特 010018)

摘要: 研究了不同的 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 浓度对比对 SOD 热稳定性的影响,并测定了 SOD 活性及利用考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量。结果表明在 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 分别为 5.4 mmol/L 和 3.6 mmol/L 时 SOD 的活性最高,达到了 92.6%;在 75℃ 时大部分杂蛋白变性沉淀,SOD 的比活力最高。最后确定在加入 5.4 mmol/L Cu^{2+} 、3.6 mmol/L Zn^{2+} 条件下,75℃ 下热变性,可以取得比较高活性和比活性的 SOD。从而为寻找更简便、经济的提纯方法提供参考依据。

关键词: SOD; 稳定性; 热变性; SOD 活性; 比活力

中图分类号: S853.51 Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)05-78-03

Heat Stability of Cu/ Zn-SOD in Cattle Blood

SHEN Yu^① WEI Jian-Min^② CHANG Hong^①

(① School of Life Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275;

② Biology Engineering College, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China)

Abstract: This study investigated effect of different concentrations of Cu^{2+} and Zn^{2+} on heat stability of SOD. The activity of SOD was measured and the content of protein was determined using coomassie brilliant blue G-250 method. The activity of SOD reached the maximum of 92.6% when the concentrations of Cu^{2+} and Zn^{2+} were 5.4 mmol/L and 3.6 mmol/L, respectively. Under the condition of 5.4 mmol/L Cu^{2+} , 3.6 mmol/L Zn^{2+} and heat-denaturalization at 75℃, the higher active SOD could be extracted. The experiment provided useful data for the development of a more simple and economical purification method.

Key words: SOD; Heat stability; Heat denaturalization; SOD activity; Specific activity

超氧化物歧化酶(superoxidized dismutase, SOD)是广泛存在于生物体内的一种金属酶^[1]。近年来,利用 SOD 清除 O_2^- 的功能,人们相继开发了一系列富含 SOD 的制品,因而近年来在国内外市场上对 SOD 的需求呈上升趋势。Cu/Zn-SOD 广泛存在于动物、植物、藻类以及某些原核生物体内,但由于从动植物体内提取 SOD 的现行工艺比较复杂,因而,从生产角度讲,应选择 Cu/Zn-SOD 含量高的生物组织或器官作为生产原料。动物血液中 Cu/Zn-SOD 含量高且资源丰富廉价,尤其是牛血的价格很低,用牛血来提取 SOD 是具有发展前途的。因此,开展 SOD 提取及相关技术的研究,对于充分利用有限的资源,创造更好的经济效益有重要的推动作用,且具有较大的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料来源 试验所用牛血采自呼和浩特回民区屠宰场 2 岁左右黄牛(肉用公牛),直接从刚屠宰的牛体内取得。

1.2 试剂 ZnSO_4 、 CuSO_4 、邻苯三酚(以 10 mmol/L 盐酸配置成 45 mmol/L 溶液,于冰箱存放)、TE(内含 6 mmol/L EDTA, Tris-HCl 0.1 mmol/L, pH 8.2)、蛋白质标准溶液

* 广东省科技计划项目(No. 2003C60103);

** 通讯作者, E-mail: ls106@zsu.edu.cn;

第一作者介绍 申煜,男,24 岁,硕士研究生;研究方向:动物生理学。

收稿日期:2004-01-18,修回日期:2004-07-20

(100 mg 牛血清蛋白,用蒸馏水定容至 100 ml)、考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂(100 mg 考马斯亮蓝 G-250,溶于 50 ml 90% 的乙醇中,加入 85% 正磷酸 100 ml,最后用蒸馏水定容至 1 000 ml)。

1.3 设计试验流程 目前,国内关于 SOD 提取的研究,主要采用文献[2]的流程,此流程复杂且成本高。

Cu/Zn-SOD 其蛋白本身含有 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 两种离子,所以根据分子进化,这两种离子的存在对 SOD 有天然的保护作用。根据文献[3],在有 Cu^{2+} 存在时,Cu/Zn-SOD 的耐热性显著提高。其机制是 Cu^{2+} 对 SOD 活性中心的构象有一定的保护作用。而 Zn^{2+} 的存在对于 SOD 的复性有促进作用,同时 Zn^{2+} 对于其它许多杂蛋白有变性作用,有利于 SOD 提取。提高耐热性对于 SOD 的提纯有重要意义,因为当温度高于 70℃ 时,红细胞中的大部分蛋白质将会沉淀下来。如果使 SOD 在较高的温度下不变性,则可以通过热变性除去大部分杂蛋白,而尽可能保留 SOD。这样可以大大简化提纯步骤,降低提取成本。基于这样的目地,设计了如下提取路线:采集新鲜血液-分离与破碎红细胞-改变 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的浓度-加热变性-离心除去变性杂蛋白-浓缩 SOD-测定活性。

1.4 分离与破碎红细胞 将新鲜牛血收集后,加入柠檬酸钠(10 kg 血液之中加入 380 mg)^[4],充分搅拌均匀后用纱布过滤,以除去血液中的杂毛及其它异物。以 3 000 r/min 的速度(下同)离心 15~20 min,收集红细胞并分装放入冰箱冷冻保存。

牛血中的 Cu/Zn-SOD 主要存在于红细胞内。在得到红细胞后必须采取适当的物理或化学方法破碎红细胞^[5],使 Cu/Zn-SOD 释放出来。在细胞中加入 7 倍体积的去离子水(或蒸馏水),温度 2℃ 左右的条件下剧烈搅拌 30 min。在分离或提取整个过程中,温度控制在 0~4℃。如有其它原因,不能及时处理时,可以冷冻保存溶血溶液,并不影响其 SOD 的活力。

1.5 Cu、Zn 离子浓度梯度 向溶液中分别加入 ZnSO_4 、 CuSO_4 ,设计 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 浓度梯度为 4 组(表 1)。

表 1 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 浓度的梯度实验组

| | C1 | C2 | C3 | C4 | Z1 | Z2 | Z3 | Z4 |
|---------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Cu 浓度(mmol/L) | 7 | 9 | 11 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Zn 浓度(mmol/L) | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 9 | 11 | 13 |

C1~C4 表示 Cu 浓度 1~4 组;Z1~Z4 表示 Zn 浓度 1~4 组

1.6 热变性除去杂蛋白浓缩收集 SOD 混匀后在 75℃ 下搅拌 30 min,然后冷却到 20℃ 左右,4℃,4 500 r/min 左右离心分离收集上清液。因为牛血 SOD 在 pH 值 5.3~9.5 范围内较稳定,所以很容易掌握 SOD 的最佳 pH

值^[6]。在上清液中加入等体积 -5℃ 以下预冷的丙酮,0℃,4 500 r/min 离心收集沉淀。(如果加入 CuSO_4 ,将沉淀物装入透析袋内在 8 倍稀释的磷酸缓冲液中进行透析)用 5 ml 磷酸缓冲液回溶。

1.7 Cu/Zn-SOD 活性检测^[7] 邻苯三酚在碱性条件下,能迅速自氧化,生成一系列在 325 nm 处有强烈光吸收的中间产物,并同时释放出 O_2^- ,SOD 是专以 O_2^- 为底物的金属酶,在有质子的介质中,它能迅速将 O_2^- 歧化,产生 O_2 和 H_2O_2 ,从而阻止了中间产物的积累,据此可测定 SOD 的活性。

1.8 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量 蛋白质染色剂考马斯亮蓝 G-250 以红色和蓝色两种不同的颜色存在,当染色剂与蛋白质结合时,红色转变为蓝色。这种结合物在 595 nm 波长下的光吸收与蛋白质含量成正比,故可用于蛋白质定量测定。先用牛血清蛋白制作蛋白质含量标准曲线,再按蛋白质含量标准曲线查出样品中蛋白质含量。比活力(%) = SOD 活性(%) / 蛋白质含量。

2 结果与分析

Cu/Zn-SOD 分别在 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 浓度梯度下的活性结果(以下数据均以 10 μl SOD 测得,各表的数据均以 5 次重复试验结果为依据求均值得出)如表 2 所示,又根据表 2 绘制了图 1 的离子浓度 SOD 活性关系图。从图 1 可以看出加入 Zn^{2+} 的 SOD 活性曲线比较缓,说明 Zn^{2+} 对 SOD 的稳定性影响不大;而 Cu^{2+} 的加入使得 SOD 活性曲线有了较大波动,说明 Cu^{2+} 对 SOD 的稳定性有明显的影 响。为了方便比较可将两个系列在相同粒子浓度下的 SOD 活性值相加为综合 SOD 活性(图 1 中 Zn^{2+} 、 Cu^{2+})。不难看出 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的浓度在 9 mmol/L 时综合 SOD 活性最高。下面就该点(9 mmol/L)进行分析。按照表 3 确定的 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 混合浓度梯度并测定 SOD 活性。测定结果如表 3 所示。

表 2 SOD 活性与离子浓度的关系

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--------------|------|-------|------|------|
| Zn-SOD 活性(%) | 59.8 | 69.6 | 25.1 | 10.1 |
| Cu-SOD 活性(%) | 25.4 | 44.7 | 45.5 | 41.5 |
| 综合 SOD 活性(%) | 85.2 | 114.3 | 70.6 | 51.6 |

从表 3 可以看出当 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 分别为 5.4 mmol/L 和 3.6 mmol/L 时 SOD 的活性最高,达到了 92.6%,充分说明该浓度配比可以很好的保护 SOD。以下就表 3 中第 3 组配比进行温度分析,将该粒子浓度下的溶液分成 5 组,制作温度梯度从 60~80℃,间隔为 5℃。同时进行

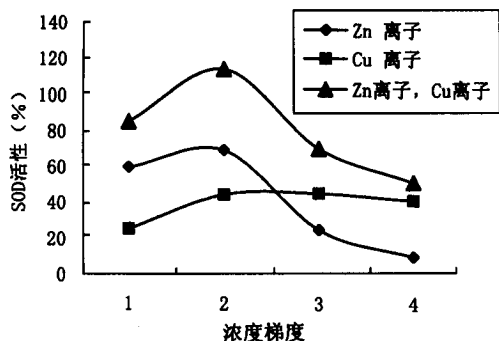


图1 离子浓度与 SOD 活性关系

比活力测定。所得结果见表 4 和图 2、3。表 4 说明在 75℃ 时的比活力最高达到了 0.2308。从图 2 可以看出, SOD 的活性总体来说是随着温度的升高而下降的,但在 75℃ 是却略有回升。图 3 表明温度越高 SOD 的纯度越高,所以比活力高。大部分蛋白质在正常情况下随着温度的升高而逐步变性,SOD 也不例外,但在 75℃ 之前变化不大,而高于 75℃ 时 SOD 受到明显破坏。在 75℃ 时大部分杂蛋白变性沉淀,SOD 的比活力最高。同样在 75℃ 取得了比较高比活力的 SOD 混合物。所以 75℃ 可以作为比较合适的提取温度。

表 3 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 混合浓度梯度与确定 SOD 活性

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------|------|------|------|------|
| Cu 浓度 (mmol/L) | 1.8 | 3.6 | 5.4 | 7.2 |
| Zn 浓度 (mmol/L) | 7.2 | 5.4 | 3.6 | 1.8 |
| SOD 活性 (%) | 70.9 | 61.2 | 92.6 | 61.6 |

表 4 SOD 活性、比活力与温度关系

| | 温度 (°C) | | | | |
|------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 |
| SOD 活性 (%) | 87.9 | 80.9 | 73.5 | 75.0 | 36.8 |
| 吸光度 | 0.945 | 0.892 | 0.739 | 0.678 | 0.657 |
| 蛋白质含量 (μg) | 459 | 429 | 340 | 325 | 317 |
| 比活力 | 0.1915 | 0.1886 | 0.2162 | 0.2308 | 0.1161 |

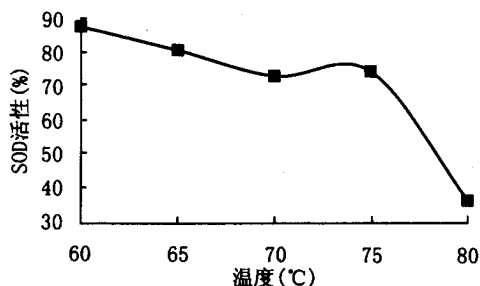


图 2 温度与 SOD 活性的关系

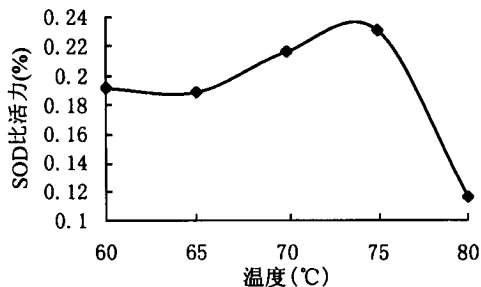


图 3 温度与 SOD 比活力的关系

以上的数据是经过多次重复试验得出结果。由于没有进一步实验,其它离子状态(更细分的离子状态)下 SOD 的耐热性不得而知。因为本实验不是以提纯为目的,为了节省经费和时间,提取的 SOD 为粗品。结果表明在恰当的 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 浓度下,SOD 具有极佳的稳定性,同样也应具有较好的耐热性,所以最佳的离子浓度是维持 SOD 稳定性的一个重要因素。经过一系列比较可以确定本实验最佳的提取条件:加入 5.4 mmol/L Cu²⁺, 3.6 mmol/L Zn²⁺, 在 75℃ 下热变性,在此条件下可以取得比较高活性和比活性的 SOD。所以在这一条件下生产 SOD 是比较适合的。可以获得比较高的产率和纯度,同时也节约了生产成本。该结果基本达到了此次实验的目的。希望这一项工作会对 SOD 的工业化生产有所帮助。

参 考 文 献

- [1] 杨卫健,张双全.超氧化物歧化酶的研究及应用前景.淮阴师范学院学报(自然科学版),2002,1(4):82~86.
- [2] 金应世,金晓玲.动物血液中提取 SOD 的工艺流程与技术.内蒙古畜牧科学,2000,4(21):44~46.
- [3] Carpenter J F, Crowe J H. Mode of stability of a protein by organic solutes during desiccation. Cry-biology, 1988, 25(5): 459.
- [4] 常雅宁,田欣,袁勤生.超氧化物歧化酶稳定性的研究.药物生物技术,1999,6(3):164~167.
- [5] 周全法,吴春芳,李锋.动物血块中 Cu/Zn-SOD 的提取研究.再生资源研究,2001,2:34~36.
- [6] 迟乃玉,张庆芳,刘长江.SOD 的化学特性及其应用.沈阳农业大学学报,1999,30(2):171~175.
- [7] 许申鸿,杭瑚,李运平.超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法的研究及改进.化学通报,2001,8:516~519.