

# 赤霉菌超氧化物歧化酶的纯化及部分理化性质

口如琴\* 白玉明 袁静明 褚西宁

(山西大学分子科学研究所 太原 030006)

**摘要** 采用加热、Sephadex G-100 凝胶过滤及 DEAE-Sephadex A-50 柱层析的方法, 提纯了赤霉菌的超氧化物歧化酶(SOD), 纯酶比活力为 2640 U /mg 蛋白, 最大紫外吸收峰为 276nm, 为 Mn-SOD, 由二个亚基组成, 亚基分子量为 14.5 kD。此外还报道了该酶的氨基酸组成。

**关键词** 赤霉菌, 超氧化物歧化酶, 纯化和性质

在细胞防御活性氧毒害的保护机制中, 起重要作用的是一种含金属离子(Cu、Zn、Fe 或 Mn)的超氧化物歧化酶(SOD)。因此 SOD 的存在和细胞的生长与多寡及细胞的发育有密切的关系<sup>[1]</sup>。有关 SOD 的报道已有很多<sup>[2]</sup>, 但真菌中 SOD 的报道却很少。为此我们提纯了赤霉菌超氧化物歧化酶, 并对其理化性质进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-100 为 Phamacia 产品, 标准蛋白为美国 Bio-Lab 公司产品, 其它化学试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 粗酶的制备:** 将赤霉菌在含 2% 葡萄糖、1% 蛋白胨、0.5% 酵母抽提粉的培养基中 28℃ 培养 54 h, 收集菌体, 加入适量的石英砂及 0.5 mol / L pH6.8 的 Tris-HCl 缓冲液, 研磨 30 min, 10 kr / min 离心 30 min, 沉淀再次加入适量的 0.5 mol / L pH6.8 的 Tris-HCl 缓冲液, 超声波处理 30 min, 离心, 合并两次上清液即为粗酶液。

**1.2.2 酶活力测定:** 按邹国林改进的邻苯三酚法<sup>[3]</sup>, 以抑制邻苯三酚自氧化速率 50% 时所需的酶量定义为一个酶活力单位。

**1.2.3 蛋白质含量测定:** 按 Lowry 法测定<sup>[4]</sup>, 以牛血清白蛋白为标准。

**1.2.4 分子量测定:** 参照 Leammli 方法<sup>[5]</sup>。

**1.2.5 紫外吸收光谱:** 由 UV-365 型紫外可见分光光度计测定。

**1.2.6 氨基酸组成:** 由日本岛津 835-50 型全自动氨基酸分析仪测定。

**1.2.7 金属元素测定:** 采用原子吸收法。

**1.2.8 活性染色:** 见文献[6]。

\* 现通讯地址: 北京 2732 信箱, 100080

本文于 1996 年 2 月 1 日收到。

## 2 结果和讨论

### 2.1 SOD的纯化

**2.1.1 加热:** 将粗酶液于 65℃ 加热 10 min, 4 kr/min 离心 30 min, 取上清液。

**2.1.2 硫酸铵沉淀:** 取上清液加固体硫酸铵至 85% 饱和度, 4℃ 放置 2 h, 10 kr/min 离心 30 min, 沉淀溶于少许 10 mmol/L pH7.8 磷酸缓冲液中, 对相同缓冲液透析 24 h, 再对蒸馏水透析 4~6 h, 冰冻干燥。

**2.1.3 Sephadex G-100 柱层析(图 1):** 将冻干粉溶于少量 10 mmol/L pH7.8 磷酸缓冲液中, 样品于相同磷酸缓冲液平衡的 Sephadex G-100 柱上过滤, 用相同磷酸缓冲液洗脱, 收集活力峰, 透析后冻干。

**2.1.4 DEAE-sephadex A-50 柱层析(图 2):** 将 SOD 干粉溶解, 通过预先经过 10 mmol/L pH7.8 磷酸缓冲液平衡的 DEAE-sephadex A-50 柱, 用含 0~1 mol/L NaCl 的相同磷酸缓冲液进行连续梯度洗脱, 将显示高活性的各管收集液合并, 对蒸馏水充分透析, 冻干后得赤霉菌超氧化物歧化酶纯品。

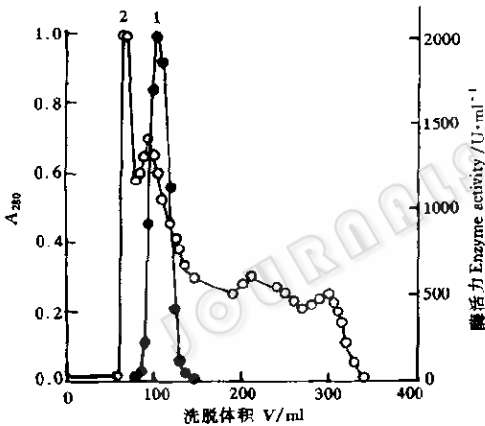


图 1 SOD 在 Sephadex G-100 凝胶柱上的洗脱曲线

Fig.1 Gel filtration of SOD on Sephadex G-100

1. Enzyme activity;
2. SOD absorption value at 280nm

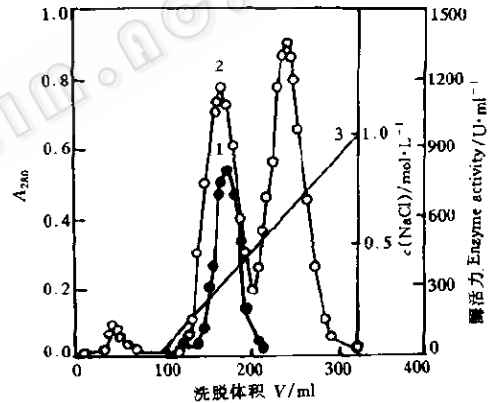


图 2 SOD 在 DEAE Sephadex A-50 柱上的洗脱曲线

Fig.2 Column chromatography of SOD on DEAE Sephadex A-50

1. Enzyme activity; 2. SOD absorption value at 280nm; 3. NaCl concentration.

**2.1.5 纯化结果见表 1.** 纯酶比活力 2640 U/mg 蛋白, 经三步柱层析, 纯化 37.1 倍, 活力回收为 44.1%。

### 2.2 纯度鉴定及理化性质

**2.2.1 纯度鉴定:** 将纯酶进行 7.5% PAGE, 结果如图 3。该酶经 PAGE 及 SDS-PAGE 均呈现一条电泳带, 且 PAGE 活性染色与蛋白染色谱带位置相对应。表明达到电泳纯。

**2.2.2 酶分子量及亚基分子量:** 将纯酶制剂经 15% SDS-PAGE(图 4) 后, 与标准分子量对

表 1 赤霉菌 SOD 的纯化总表

Table 1 Purification of SOD from *Fusarium moniliform*

步骤 Steps	体积 Volum (ml)	总活力 Total act. (U)	总蛋白 Total pro. (mg)	比活 Sepec.act. (U/mg)	纯化倍数 Pur.fold	活力回收 Act.rec.
Crude enzyme	1, 155	48 510	681.5	71.2	1.0	100
After heating	1, 075	43 768	271.3	161.3	2.3	90.2
SA precipit.	—	30 808	61.5	501.0	7.0	63.5
Sephadex G-100	—	22 670	11.3	2 005.2	28.2	46.7
DEAE Sephadex A-50	—	21 400	8.1	2 640.3	37.1	44.1

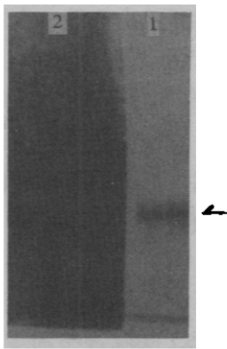


图 3 SOD 的凝胶电泳

Fig.3 PAGE of SOD

1. 蛋白染色 Protein stain;
2. 活性染色 Active stain.

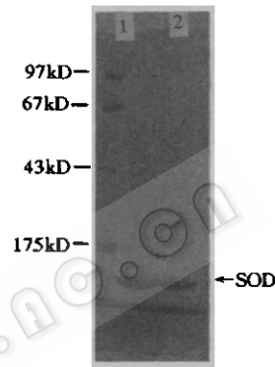


图 4 SOD 的 SDS 凝胶电泳

Fig.4 SDS-PAGE of SOD

1. 标准蛋白 Marker; 2. SOD

表 2 赤霉菌超氧化物歧化酶的氨基酸组成\*

Table 2 The composition of amino acids of the native enzyme

氨基酸 Amino acid	数目 Numbers	氨基酸 Amino acid	数目 Numbers
Asp	10	Tyr	3
Thr	6	Phe	3
Ser	7	Arg	2
Ile	5	Cys	0
Leu	2	Val	5
NH <sub>4</sub>	8	Met	0
Glu	10	Lys	7
Gly	10	His	4
Ala	9	Pro	1

\* Trp: 未测 Trp: Not measured

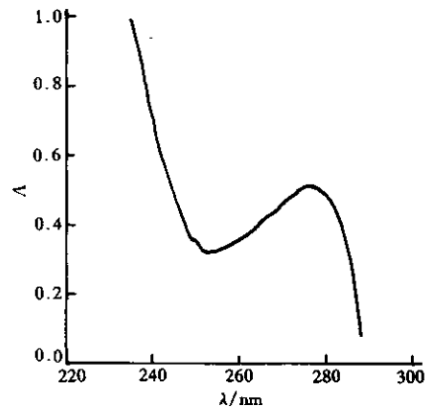


图 5 SOD 的紫外吸收

Fig. 5 Ultraviolet spectrum of the native SOD

照, 其分子量为 14.5kD, 用 Sephadex G-150 凝胶过滤法测得分子量约为 30kD, 这与文献报道的 SOD 分子量基本相同。表明赤霉菌超氧化物歧化酶由两个分子量相同的亚基组成。

2.2.3 紫外吸收光谱: 赤霉菌超氧化物歧化酶最大吸收峰为 276nm(图 5), 与其它来源的

SOD最大吸收峰在 250 ~ 270nm 之间不一致。其原因是该酶含有较多的 Trp 及 Tyr。

**2.2.4 氨基酸组成:** 赤霉菌超氧化物歧化酶氨基酸组成见表 2。该酶含有三个酪氨酸, 这与其紫外吸收最大峰在 276nm 结果相一致。

**2.2.5 金属元素测定:** 赤霉菌超氧化物歧化酶为 Mn-SOD。不含 Cu 和 Zn 元素。

### 参 考 文 献

- [1] Michelson A M. Toxicity of superoxide radical anions. Michelson A M, McCord J M and Fridovich I. eds. London, New York, Sanfrancisco: Superoxide and superoxide dismutase Academic press, 1977. 245 ~ 256.
- [2] 杨 苓, 邹国林, 朱汝璐. 生物化学杂志, 1989, 5(2), 169 ~ 174.
- [3] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 生物化学与生物物理进展, 1986, 4 71 ~ 75.
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981. 165.
- [5] Leammli U K. *Nature*, 1970, 227: 680 ~ 685.
- [6] Beauchamp C, Fridovich I. *Bioanalyt Biochem*, 1971, 44: 267 ~ 287.

## PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF SUPEROXIDE DISMUTASE FROM *FUSARIUM MONILIFORM*

Kou Ruqin Bai Yuming Yuan Jingming Chu Xining

(*Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006*)

**Abstract** Superoxide dismutase from *Fusarium moniliform* was purified by the steps including heating, ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 gel filtration and DEAE-Sephadex A-50 chromatography. The results showed that the enzyme was a Mn-SOD with the specific activity of 2640 U /mg and had two homogenous subunits whose molecular mass were 14.5 kD. The wave length of max. absorbing peak in ultraviolet spectrum was 276 nm which was not similar with other resource of SOD. The composition of amino acid was also analyzed.

**Key words** *Fusarium Moniliform*, Superoxide dismutase, Purification, and properties