

卷烟工业

领导信箱

ldxx@tobacco.gov.cn

烟草论坛

留言板

电子邮件定制

短信互动

国家烟草专卖局总机

010-63605000

新闻投稿热线:

010-63606303

010-63605947

010-63605142

cx-out@tobacco.gov.cn

烟叶铜锌超氧化物歧化酶的分离、纯化与性质

2007-06-07

目前,国内外已开展了一些有关烟草超氧化物歧化酶(SOD)的研究,如 BAKARDJIA 等<sup>[1]</sup>在对绿色和黄色烟草组织的比较中发现,绿色烟草组织的 SOD 活性高,同工酶数目多;穆虹等<sup>[2]</sup>在烟叶的粗酶液中发现 6 条 SOD 同工酶带,并纯化得到 FeSOD;张艳红等<sup>[3]</sup>从烟叶中分离纯化出 1 种铜锌超氧化物歧化酶(CuZnSOD),其聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)显示 3 条蛋白带;CAMP 等<sup>[4]</sup>用凝胶电泳确定了烟叶中 5 种同工酶:1 种线粒体 MnSOD、1 种叶绿体 FeSOD 和 3 种细胞质 CuZnSOD;RAGUSA S 等<sup>[5]</sup>从烟叶中分离纯化出 CuZnSOD I 纯品,但未能把 CuZnSOD II 和 III 分开,因此进行了烟叶 CuZnSOD 同工酶的分离与纯化试验。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

离子交换纤维素( DEAE-52 ) (  $\varnothing$  2.6cm  $\times$  60cm ) ( Whatman 公司 ); 葡聚糖凝胶 ( G-75 ) ( Pharmacia 公司 ); 丙烯酰胺 ( AR, Sigma 公司 ); 甲叉双丙烯酰胺和考马斯亮兰 R-250 ( AR, Fluka 公司 ); 三羟甲基氨基甲烷 ( Tris ) ( AR, 德国 Merck 公司 ); 溴酚蓝 ( AR, 珠海丽宝生化制药厂 ); 过硫酸铵 ( AR, 中国医药集团上海化学试剂公司进口分装 ); 琼脂糖 ( 电泳级, 中国科学院生物物理研究所生化厂 ); 其它试剂为国产优级纯或分析纯;去离子水;2004 年 6 月下旬于安徽省合肥市取 K326 ( *Nicotiana tobacum* ) 成熟的上部烟叶,用纯净水洗净,在  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

Z 型系列层析柱 ( 上海锦华实验器械厂 ); BS-100A 型自动部分收集器 ( 上海沪西电子仪器

100A型自动部分收集器(上海沪西电子仪器厂);L-1型蠕动泵(上海新波无线电厂);2000 mL梯度混合器(上海西巴斯生物技术开发公司);透析袋(截留相对分子量为8000~12000Da的分子)(上海西巴斯生物技术开发公司);pHS-3C型pH计(上海雷磁仪器厂);LDI 1700-MALDI-TOF-MS型激光解析飞行时间质谱仪(美国Biomolecular公司);Hitachi 835氨基酸自动分析仪(日本日立公司);Lambda II型UV-Vis光度计和LS 55型荧光光度计(Pekin Elmer公司);BP211D型电子天平(感量0.00001g,德国Sartorius公司)。

## 1.2 烟叶CuZnSOD的分离纯化<sup>[6]</sup>

### 1.2.1 粗酶液的提取<sup>[6]</sup>

将1kg烟叶搅碎匀浆,用1000mL 50mmol/L (pH7.6)磷酸盐缓冲液(PBS)4℃下浸泡过夜,用4层纱布过滤;滤液在10000r/min 4℃下冷冻离心8min,得上清液,上清液中加入硫酸铵至饱和度为55%~60%(质量分数),4℃下冷藏过夜,离心分离(14000r/min,15min);沉淀用150~200mL 50mmol/L PBS溶解,加入0.25倍(体积比,下同)的冷冻无水乙醇和0.15倍的冷冻氯仿,4℃下冷藏2h,离心分离(14000r/min,15min);取上清液,加入3倍的冷冻丙酮,冷藏2h,抽滤,沉淀用20mmol/L PBS缓冲液溶解,采用包埋法<sup>[7]</sup>透析(透析袋外包埋有聚乙二醇20000)浓缩至10mL,得粗酶液。

### 1.2.2 柱层析<sup>[6]</sup>

将粗酶液倾入DEAE-52柱上,用20mmol/L PBS平衡洗脱6h(流速0.25mL/min),改为线性梯度洗脱(20和100mmol/L PBS各600mL),流速0.25mL/min。柱平衡(流出液的pH和洗脱液的pH相同,下同)后开始用10mL试管收集洗脱液,每管收集约6mL,采用邻苯三酚法<sup>[8]</sup>测定每管洗脱液的酶活性,合并有活性的洗脱液,采用包埋法透析浓缩至10mL。浓缩液进行二次DEAE-52柱层析,洗脱梯度30~100mmol/L PBS,流速0.25mL/min。洗脱液的收集与处理与第一次DEAE-52柱层析完全相同,得到的浓缩液倾入G-75凝胶柱上,用10mmol/L (pH7.6) PBS洗脱,流速0.3mL/min,洗脱液的收集同第一次柱层析,得到的浓缩液于-20℃下冷冻干燥,得酶制剂。

## 1.3 活性测定、PAGE电泳

按照文献[8]和[9]介绍的方法分别进行酶活性的测定和 PAGE 电泳。

#### 1.4 分子量测定<sup>[9]</sup>

取 1.0mg 酶制剂,溶解于 1.0mL 0.1% (质量分数)三氟乙酸和介子酸的混合水溶液中,取 1 $\mu$ L 此溶液,滴于 MALDI-TOF-MS 仪样品探头靶心上,真空抽去溶剂,结晶后快速送入离子源进行测定,信号累加 100 次。仪器操作参数为:氮激光器波长:337nm;排斥电压:30kV;吸引电压:9.3kV;系统真空度:1.13  $\times 10^{-3}$  Pa。

#### 1.5 氨基酸组成分析<sup>[11]</sup>

称取 3.0mg 酶制剂,置于 5.0mL 6mol/L 盐酸中,室温下水解 24h,半胱氨酸(Cys)和蛋氨酸(Met)残基用过甲酸氧化,色氨酸(Trp)残基用碱水解。采用的柱子规格为:4.0mm  $\times$  250mm,固定相:2619 型离子交换树脂;流动相:0.07mol/L 柠檬酸钠溶液,流速 0.22mL/min;衍生试剂:0.1% (质量分数)茚三酮溶液,流速 0.3mL/min;柱温:53 $^{\circ}$ C。

#### 1.6 光谱特征测定

准确称取适量酶制剂,用去离子水配制成 10  $\mu$ mol/L 贮备液,以去离子水为参比,分别用 UV-Vis 光度计测定其紫外可见光谱,用 LS 55 型荧光光度计测定其荧光(激发和发射带宽均为 10nm)光谱。

#### 1.7 烟叶 CuZnSOD 的酶学特征测定

##### 1.7.1 pH 对酶活性的影响测定<sup>[8]</sup>

取 pH4.49、5.00、6.00、7.00、8.00、9.00、9.27 和 10.6 PBS 各 25 $\mu$ L,分别置于 1mL 离心管中,加入 25 $\mu$ L 酶液,充分摇匀,室温下保持 30min,取 40 $\mu$ L,加入 4.5mL 50mmol/L (pH 8.2) PBS 中,测定其酶活性<sup>[8]</sup>。

##### 1.7.2 温度对酶活性的影响测定

取 6 支 10mL 试管,各加入 4.5mL 50mmol/L (pH 8.2)磷酸盐缓冲溶液和 10 $\mu$ L 酶液,分别于 20、30、40、50、60 和 70 $^{\circ}$ C 水浴锅中保温 20min,而后迅速冷却至室温,测其剩余的酶活性<sup>[8]</sup>,考察 CuZnSOD 的热稳定性。

##### 1.7.3 外源试剂对酶活性的影响测定

在 25 $\mu$ L 1.0  $\times 10^{-5}$  mol/L 的酶反应体系中加入 25 $\mu$ L 0.2mol/L 盐酸胍(GdnHCl)溶液,30min 后取 40 $\mu$ L 测其活性,以不加盐酸胍的 SOD 溶液的起始活力作对照,测定酶活性<sup>[8]</sup>的变化。依照

此法测定  $H_2O_2$ 、KCN、十二烷基磺酸钠(SDS)和 EDTA 对 SOD 活性的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 烟叶中 CuZnSOD 的分离纯化

PAGE 电泳结果(图 1)显示,烟叶匀浆液含有 5 条 SOD 活性带,根据不同抑制剂的敏感性分别被确认为 MnSOD、FeSOD 和 3 种 CuZnSODs<sup>[4]</sup>。

一次 DEAE-52 层析后分离得到 3 条活性带(图 2),分别是 CuZnSOD I、CuZnSOD II 和 CuZnSOD III<sup>[4]</sup>。二次 DEAE-52 柱层析改用 30 ~ 100mmol/L PBS 的线性梯度洗脱,其他条件不变,CuZnSOD I 和 CuZnSOD III 的吸收峰和活性峰(图 3)重合,所含杂蛋白也较少。二次 DEAE-52 活性组分过 G-75 柱后,CuZnSOD I 和 CuZnSOD III(图 4)均达到很高的均一性。

从烟叶中分离纯化 CuZnSODs 比较困难,而且收率较低,CuZnSOD III 的分离比 CuZnSOD I 更难。国外学者通过 DEAE-Sephadex A-50(洗脱液:0.0 ~ 0.6mol/L KCl 溶液),DEAE-Sephadex(洗脱液:0.0 ~ 0.6mol/L NaCl 溶液)和 Sephadex G-100 柱层析,分离纯化出 CuZnSOD I,但未能将 CuZnSOD II 与 CuZnSOD III 分开<sup>[5]</sup>。本实验通过采用 20 ~ 100mmol/L PBS 的线性梯度洗脱,控制洗脱体积 1.2L(600mL - 600mL)和洗脱速度 0.25 mL/min,成功地将 CuZnSOD II 与 CuZnSOD III 分开;但优化色谱条件后,仍未能得到 CuZnSOD II 纯品。PALMA 等<sup>[12]</sup>发现,在西瓜子叶的 CuZnSOD I 纯化过程中有一种糖蛋白一起被分离出,这种糖蛋白在电泳中和 CuZnSOD I 一起迁移,用特异性很高的亲和层析可除去,因而,能否采用特异性很高的亲和层析等手段从烟叶 CuZnSOD I 纯化过程中分离这种糖蛋白,进而确认这种糖蛋白是否是烟叶 CuZnSOD II 有待进一步研究。

从植物组织中提取 SODs 的另一个问题是多酚及其氧化产物的影响<sup>[10]</sup>。粗酶液直接上 DEAE-52 柱,离子交换树脂被色素污染严重,导致离子交换树脂分离能力变差。本实验通过添加固态 DEAE-52 提取过程,不仅可以有效地去除色素的影响,达到粗分离效果,而且可减少后序 DEAE-52 柱层析所用离子交换树脂的污染;前处理中,

选用硫酸铵 55% ~ 60% 的饱和度达到较佳的盐析效果,用 0.25 倍体积的冷冻乙醇和 0.15 倍的氯仿混合液可去除提取液中的 FeSOD、MnSOD 和部分其他杂蛋白,用 3 倍体积丙酮沉淀,活性回收最大<sup>[6]</sup>。

## 2.2 烟叶 CuZnSOD 的相对分子质量

CuZnSOD I 的 MALDI-TOF-MS 谱(图 5a)有 5 个明显的峰,其中,  $m/z$  为 15007 和 21544 Da 的前 2 个峰分别属于蛋白质 2 个亚基的离子峰,  $m/z$  为 30351、36682 和 43280 Da 的后 3 个峰,属于前 2 个峰的组合; CuZnSOD III 有 1 个明显的离子峰(图 5b),  $m/z$  为 22976 Da。因此, CuZnSOD I 和 CuZnSOD III 的相对分子质量分别为 30682、22976 Da。

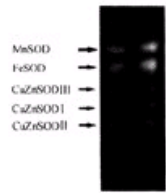
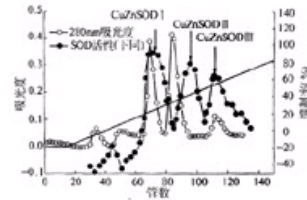
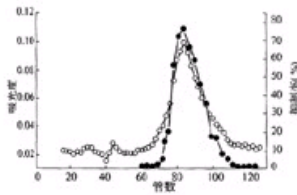


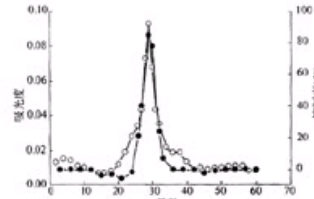
图 1 烟草 SOD 粗酶液活性电泳



20 ~ 100 mmol/L (pH 7.6) PBS 线性洗脱梯度  
图 2 烟叶粗酶液过 DEAE-52 时的洗脱曲线



30 ~ 100 mmol/L (pH 7.6) PBS 线性梯度洗脱  
图 3 CuZnSOD III 二次 DEAE-52 洗脱曲线



洗脱液 5 mmol/L (pH 7.6) PBS  
图 4 CuZnSOD III 过 G-75 洗脱曲线

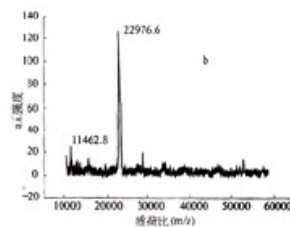
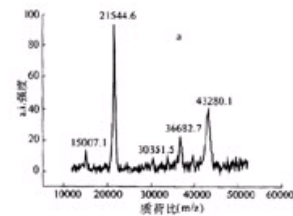


图 5 CuZnSOD I (a) 和 CuZnSOD III (b) 的 MALDI-TOF-MS

## 2.3 烟叶 CuZnSOD 的氨基酸组成

由表 1 看出,烟叶 CuZnSOD I 由 302 个氨基酸残基组成, CuZnSOD III 含 187 个氨基酸残基。这 2 种同工酶都有较多的 Gly(甘氨酸)、Glu(谷氨酸)、Ser(丝氨酸)和 Asp(天冬氨酸),而含有较少的 Tyr(酪氨酸)、Met(蛋氨酸)和 Trp(色氨酸)。不同来源的 CuZnSOD 有高度的序列均一性<sup>[5]</sup>。烟叶 CuZnSOD I 是二聚体,与番茄、牛来源的酶序列均一性分别是 94% 和 56%<sup>[5]</sup>;由于未制备出纯品,故烟叶 CuZnSOD II 的结构还不清楚;烟叶 CuZnSOD III 的

氨基酸组成很特别,是一个单亚基酶,由 187 个氨基酸残基组成,BATTISONI A 等<sup>[13-14]</sup>曾从 *E. coli* 中分离出一种热稳定性 CuZnSOD 单亚基酶。

#### 2.4 烟叶 CuZnSOD 的酶学特征

测试结果显示,CuZnSOD I 在 pH6.0 左右活性最高,最适温度为 40℃,CuZnSOD III 在 pH5.0~6.0 时有很高活性,最适温度为 30℃;在 pH 4.0~9.0,这 2 种同工酶都具有较高的活性。

表 1 CuZnSOD I 和 CuZnSOD III 的氨基酸组成

CuZnSOD	赖氨酸/	组氨酸/	精氨酸/	天冬氨/	苏氨酸/	丝氨酸/	谷氨酸/	脯氨酸/	甘氨酸/
	Lys	His	Arg	酸 Asp	The	Ser	Glu	Pro	Gly
I	14	12	5	32	26	26	30	18	60
III	10	12	2	20	11	20	22	10	27
CuZnSOD	丙氨酸/	半胱氨酸/	缬氨酸/	蛋氨酸/	异亮氨酸/	亮氨酸/	酪氨酸/	苯丙氨酸/	色氨酸/
	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Trp
I	22	1	18	1	11	16	3	7	0
III	13	1	9	1	6	11	5	6	1

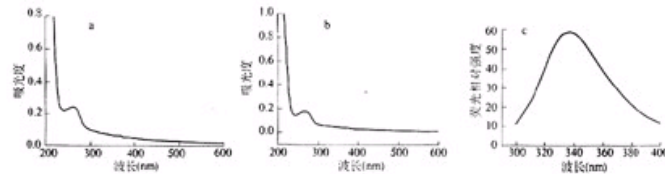


图 6 CuZnSOD I (a)、CuZnSOD III (b) 的紫外吸收光谱和 CuZnSOD III (c) 的荧光光谱

表 2 抑制剂对 CuZnSOD III 活性的影响

抑制剂	浓度 (mol/L)	活性 (%)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.1 × 10 <sup>-3</sup>	19.4
KCN	1.1 × 10 <sup>-3</sup>	10.2
SDS	0.12	33.2
GdnHCl	0.2	49.0
EDTA	1.1 × 10 <sup>-3</sup>	88.7

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、KCN、SDS 和 GdnHCl 对 CuZnSOD III 的活性均有一定的抑制,而 EDTA 的抑制作用并不明显(表 2)。

由图 6 看出,CuZnSOD I 和 CuZnSOD III 的最大紫外吸收峰分别在 262 和 269nm。CuZnSOD III 的最大荧光激发波长和发射波长分别为 280 和 338nm,与自由 Trp 相比,其最大发射波长蓝移了 17nm,说明其 Trp 残基处于较为疏水的环境中<sup>[15]</sup>。

### 3 结论

由 K326 烟叶中分离纯化出 CuZnSOD I 和 CuZnSOD III。CuZnSOD I 由 302 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 36682 Da,最大吸收波长 262nm,最适 pH6.0 左右,最适温度 40℃; CuZn-

SODⅢ含187个氨基酸残基,相对分子质量为22976 Da,最大吸收波长269nm,最大荧光激发波长和发射波长分别为280nm和338nm,最适pH 5.0~6.0,最适温度30℃;虽然PAGE电泳能将CuZnSODⅡ分离开,但未制备出纯品,其结构有待进一步研究。

(南京卷烟厂技术中心)

郑晓云 王瑞 甘学文 陈晶波

摘自《烟草科技》2007年第4期



主管: 国家烟草专卖局办公室

地址: 中国北京西城区月坛南街55号(100045)

建议使用: 800\*600分辨率以上, IE5.0以上浏览器

未经许可, 本网站包括图像、图标、文字在内的所有数据不得转载

主办: 国家烟草专卖局信息中心

备案序号: 京ICP备05033420号