

文章编号:1673-1689(2008)01-0103-06

耐盐节杆菌 *Arthrobacter pascens* DMDC12 中 Mn-SOD 的纯化及性质

刘妮娜¹, 姚忠¹, 叶艳华¹, 方民², 何冰芳^{*1}

(1. 南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009; 2. 无锡日用化工应用研究所, 江苏 无锡 214045)

摘要: 作者从自行分离的高度耐盐菌 *Arthrobacter pascens* DMDC12 中分离提取超氧化物歧化酶(SOD), 粗酶液经硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sapharose FF 及 Source 15Q 柱层析, 获得了电泳纯的 SOD。其亚基相对分子质量 23 300, 比活力为 2 183 U/mg, 纯化倍数为 53, 回收率 51%。根据 SOD 同功酶对抑制剂氯仿、乙醇和 H_2O_2 的敏感性, 判断其为 Mn-SOD。金属离子 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶产生一定抑制, Fe^{2+} 对酶产生显著的抑制, 0.5 mmol/L 的 Mn^{2+} 对酶有激活作用, 进一步证实该酶为 Mn-SOD。该酶在 45 °C 以下、pH 5~9 范围内显示较好的稳定性。相关研究进一步验证了极端微生物是 Mn-SOD 的重要酶源。

关键词: 耐盐节杆菌; Mn-SOD; 纯化; 性质

中图分类号: Q 814.1

文献标识码: A

Purification and Characteristics of Mn-SOD from Halophilic *Arthrobacter pascens* DMDC12

LIU Ni-na¹, YAO Zhong, YE Yan-hua¹, FANG Min², HE Bing-fang^{*1}

(1. College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. Applied Institution of Commodity and Chemical Engineering, Wuxi 214045, China)

Abstract: Superoxide dismutase was considered as a metalloenzyme with the ability of resisting oxydative stress. SOD has extensive function, such as antiradiation, antiaging and anticancer. In this manuscript, a kind of SOD from the strain of *Arthrobacter pascens* DMDC12 was purified. The crude enzyme was purified by ammonium sulfate fractional pricipitation, DEAE Sepharose FF chromatography and Source 15Q chromatography. The purified enzyme showed homogeneity and subunit molecular weight of 23.3Kda on electrophoresis of sodium dodecyl sulfate polyacylamide slab gel. The purification resulted in 53-fold purification with a 51% recovery of total activity. The specific activity of purified SOD was reached 2183U/mg. The inhibit test of H_2O_2 and chlorofrom-ethanol to SOD showed that the purified enzyme was Mn-SOD. Strong inhibition by Fe^{2+} and weak inhibition by Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} and Cu^{2+} to the SOD were

收稿日期: 2006-09-10.

基金项目: 国家 973 计划项目(2004CB719600).

作者简介: 刘妮娜(1981-), 女, 江苏南京人, 生物化工硕士研究生.

* 通讯作者: 何冰芳(1962-), 女, 浙江黄岩人, 理学博士, 教授, 博士生导师. 主要从事应用微生物方面的研究.

Email: bingfanghe@njut.edu.cn

observed, while Mn^{2+} of 0.5 mol/L provided slight stimulation. The Mn-SOD was further proved. The purified SOD showed good stability under 45°C and over the pH range 5.0 to 9.0. These results also suggested that extremophiles could be as good resource of Mn-SOD.

Key words: halophilic arthrobacter; manganese superoxide dismutase; purification; property

超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)反应性强,对生物危害大,甚至和人类的癌症、衰老及其他多种疾病有关。超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,简称 SOD, EC. 1.15.1.1)是催化生物体中 $O_2^{\cdot-}$ 分解,保护细胞免受损伤的一类金属酶,广泛存在于需氧和耐氧生物体内。按其金属辅基的不同可分 3 类^[1]: Cu Zn-SOD,存在于真核生物,特别是动物血红细胞中含量较高; Mn-SOD,存在于真核生物线粒体及少数原核生物特别是极端微生物; Fe-SOD,存在于原核生物和高等植物叶绿体。SOD 已广泛应用于临床、食品和化妆品等领域,其中 Cu Zn-SOD 多用于皮肤的抗衰老,而 Mn-SOD 有较强的抗辐射作用,近期又被认为是一种新型肿瘤抑制因子而备受关注^[2]。

屠幼英采用盐析、超滤、两次 DE-32 离子交换的方法从嗜热栖热菌中提取了 Mn-SOD^[3],高静采用相关分离手段,纯化了疏棉状嗜热丝孢菌的 Mn-SOD^[4]。两者均来源于嗜热微生物,另有报道通过离子注入等电离辐射对生物体的作用,可有效诱导耐辐射异常球菌中 Mn-SOD 的表达^[5],并推测这与辐射这一极端环境有密切关系。

高度耐盐菌 *Arthrobacter pascens* DMDC12 在柠檬酸体系中培养后产生大量 Mn-SOD^[6]。为了探讨 Mn-SOD 与极端微生物的相关性,作者对该菌种的 SOD 进行了分离纯化,并对其性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 耐盐菌 *Arthrobacter pascens* DMDC12 由作者所在实验室筛选并保存^[7]。

1.1.2 试剂和仪器 柠檬酸为和光纯药公司产品,酵母提取物为 DIFCO(USA)产品, Cu /Zn-SOD 标准品由无锡日用化工应用研究所提供,其余生化试剂均为国产和进口分析纯。

蛋白纯化系统为 Amersham pharmacia 产品,型号为 AKTA™explorer100;高压均质破碎机为德国 GEA 集团尼鲁索尔维公司产品,型号为 NS1001LPanda 2K。

1.1.3 培养基

1) 平板培养基(g/L):柠檬酸,5;酵母提取物

(YE), 0.1; KH_2PO_4 , 10; NH_4NO_3 , 2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.015; $MgSO_4$, 0.5;琼脂,15; pH 7.5。

2) 发酵培养基(g/L):柠檬酸,2.2;YE,2.5; KH_2PO_4 , 10; NH_4NO_3 , 2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.015; $MgSO_4$, 0.5; pH 7.2。

1.2 方法

1.2.1 酶活力测定 参照袁勤生的微量邻苯三酚法^[8],1 mL 反应液中每分钟抑制 50 mmol/L 邻苯三酚自氧化速率为 50% 时所需酶量定义为一个酶活力单位。

1.2.2 蛋白质质量浓度测定 参照 Bradford 法^[9],以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.2.3 蛋白质纯度鉴定与亚基相对分子质量测定

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳^[10],浓缩胶和分离胶质量浓度分别为 4 g/dL 和 12.5 g/dL 的丙烯酰胺。

1.2.4 粗酶液的提取 菌株经平板活化后接种至发酵培养基,30 °C、220 r/min 培养约 20 h。离心获得细胞,用 50 mmol/L pH 7.6 的磷酸缓冲液配成菌悬液($OD_{600} \approx 25$)。高压均质破碎机于 1 200 MPa 破碎 3 次。破碎液冷冻离心去除细胞碎片,收集上清即为粗酶液。

1.2.5 SOD 的分离纯化

1) DEAE Sepharose FF 离子交换层析:平衡缓冲—A 液 5 mmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液;洗脱缓冲—B 液 5 mmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液+1 mol/L NaCl。上述沉淀用少量 A 液溶解并在 A 液中透析。透析后的酶液离心,上清液加到用 A 液平衡的 DEAE Sepharose FF 阴离子交换柱(2 cm×20 cm)。洗脱流速为 3 mL/min,先用 15% B 洗脱 2~3 个柱体积,再以 15%~40% B 梯度洗脱。分管收集并检测酶活,合并活力组分。

2) Source 15Q 离子交换层析:平衡缓冲—A 液 15 mmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液;洗脱缓冲—B 液 15 mmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液+1 mol/L NaCl。收集的 SOD 活力组分用 A 液进行低温动态透析 4 h。透析后的酶液离心,上清液加到用 A 液平衡的 Source 15Q 阴离子交换柱(1.5 cm×10 cm)。洗脱流速为 2 mL/min,先用 10% B 洗脱 2~

3 个柱体积,再以 10%~40%B 梯度洗脱。分管收集并检测酶活,合并有活力的组分。

1.2.6 酶类型的鉴定 采用抑制剂敏感性实验,分别测定 SOD 在不同体积分数氯仿:乙醇溶液和 H₂O₂抑制下的相对活力,并以标准 Cu Zn-SOD(牛血)为参照。

1) 氯仿:乙醇对酶活性的影响:配制氯仿-乙醇(体积比为 2:3)的溶液,分别按酶液与抑制剂 1:2,1:4,2:1 体积混合,25℃处理 10 min,加入相同体积蒸馏水的酶活为对照,测定酶的相对活力。

2) 过氧化氢对酶活性的影响:向酶液中分别添加一定量的 H₂O₂,使其终浓度分别为 5、10 mmol/L,25℃处理不同时间,以加入蒸馏水的酶活为对照测定酶的相对活力。

1.2.7 SOD 的热稳定性与 pH 稳定性 纯化的酶液分别置于不同温度下(25、45、50、60、70℃)保温,一定时间后取出,立即冷却至 4℃,以未处理的酶活为对照,测定酶的相对活力。

纯化的酶液,加不同 pH 值的缓冲液置于 25℃30 min。以加入蒸馏水的酶活为对照测定酶的相对活力。

1.2.8 金属离子对酶的影响 纯化所得酶液先用 5 mmol/L 磷酸缓冲液透析,再用纯水透析以除去纯化步骤中的离子干扰。在透析后的酶液中添加不同金属离子(Mg²⁺、Ba²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺),使其终浓度分别为 0.5、1、10 mmol/L,测定在金属离子存在时的酶活力,以不加金属离子的酶活力为对照测定酶的相对活力。

2 结果与讨论

2.1 SOD 的分离纯化

粗酶液经硫酸铵分级沉淀回收率偏低是由于高盐浓度在一定程度上影响酶活的检测。取 30%~50%的沉淀组分,透析后采用 DEAE Sepharose FF 与 Source 15Q 两步离子交换层析。图 1,2 分别为两次柱层析的洗脱曲线,下面的小峰为 SOD

酶活回收曲线。DEAE Sepharose FF 离子交换在 27%~30%B 洗脱阶段出现活力峰,Source 15Q 离子交换在 25%~40%B 洗脱阶段分离的蛋白质吸收峰正好与活力峰重叠,分离效果较好,收集的样品用于进一步的纯度和性质研究。

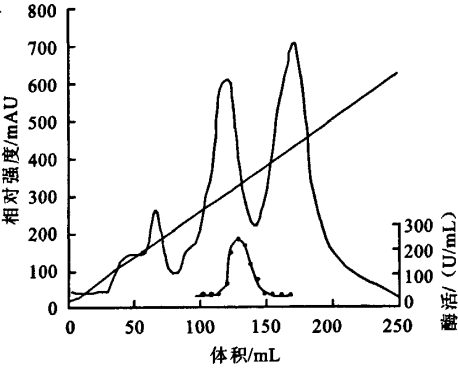


图 1 SOD 酶 DEAE Sepharose F. F 阴离子交换层析图
Fig.1 DEAE Sepharose F. F anion ion exchange chromatography of SOD sample

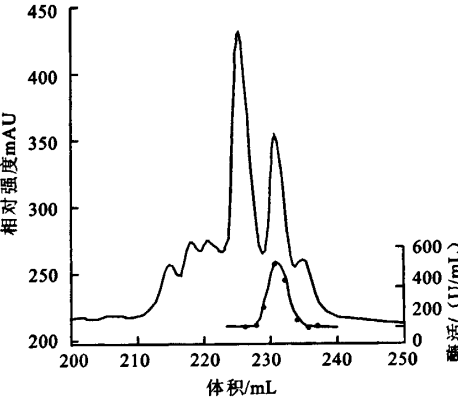


图 2 SOD 酶 Source 15Q 阴离子交换层析图
Fig.2 Source 15Q anion ion exchange chromatography of SOD sample

各步纯化结果见表 1。经过硫酸铵分级沉淀及两次离子交换层析,SOD 的最终比活力达 2 183 U/mg,纯化了 53 倍,酶活回收率为 51%,该回收率高于文献[11] 的报道。

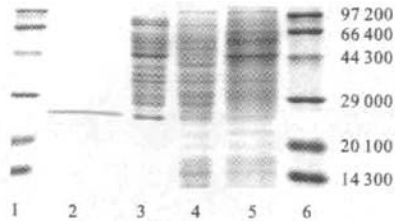
表 1 *Arthrobacter pascens* DMDC12 SOD 的纯化

Tab.1 Purification of SOD from <i>Arthrobacter pascens</i> DMDC12						
步骤	总体积/ mL	总酶活/ U	总蛋白质质量/ mg	比活力/ (U/mg)	纯化 倍数	活力 回收/%
粗酶液	617	34 500	834	41	1	100
硫酸铵分级沉淀	68	23 664	325	73	1.8	69
DEAE-Sepharose FF	45	20 250	68	296	7.2	59
Source 15Q	54	17 470	8	2 183	53	51

2.2 SDS-PAGE 电泳纯度鉴定及亚基相对分子质量测定

将每步纯化的样品进行 SDS-PAGE 电泳,比较蛋白质谱带的变化。由图 3 可见,随着纯化步骤的进行,杂蛋白质得到了显著去除,Source 15Q 分离后样品最终呈现单一条带,表明分离的 SOD 达到了电泳纯。

测量各蛋白质的电泳迁移率,并通过标准曲线、回归方程($Y=4.988\ 5-0.873\ 51X$, $R=0.999\ 4$)计算,测得该酶的亚基相对分子质量为 23 300。



1. 1,6 标准相对分子质量蛋白质; 2. Source 15Q 离子交换层析后 SOD 酶液; 3. DEAE-Sephacrose FF 离子交换层析后的 SOD 酶液; 4. 硫酸铵分级沉淀后的 SOD 酶液; 5. 细胞破碎后粗酶液

图 3 *A. pascens* DMDC12 SOD 纯化各阶段的电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purification of SOD from *A. pascens* DMDC12

2.3 SOD 酶金属类型的鉴定

2.3.1 氯仿-乙醇(体积比 2 : 3)对酶活性的影响

在氯仿-乙醇的作用下,Mn-SOD 和 Fe-SOD 活性易受抑制,而 Cu Zn-SOD 不受严重影响。作者采用氯仿-乙醇处理后,对照 Cu Zn-SOD 受影响很小,而 *A. pascens* DMDC12 来源的 SOD 在酶与抑制剂以 2:1 体积混合后,活力仅保留 9%,表明该酶对氯仿-乙醇很敏感,见表 2。

表 2 氯仿-乙醇对 *A. pascens* DMDC12 SOD 酶的影响

Tab. 2 Effect of Chloroform-ethanol on SOD activity from strain DMDC12

SOD 样品	酶活力/%		
	酶 : 抑制剂比例		
	1 : 2	2 : 1	4 : 1
Cu Zn-SOD	82	100	100
DMDC12-SOD	0	9	81

2.3.2 H_2O_2 对酶活性的影响 用 10 mmol/L H_2O_2 处理纯化的 SOD 2 h,活力仍保留近 90%;而 Cu Zn-SOD 用 5 mmol/L H_2O_2 处理 30 min 后,酶活损失严重,见图 4。根据 Fe-SOD,Cu Zn-SOD 在 H_2O_2 作用下失活,而 Mn-SOD 活性影响较小的原

理^[12],综合两抑制剂敏感性实验结果,作者所提取的 SOD 为 Mn-SOD。

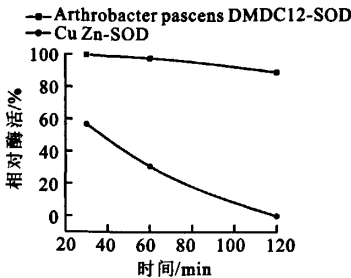


图 4 H_2O_2 对 SOD 酶的影响

Fig. 4 Effect of H_2O_2 on SOD from strain DMDC12

2.3.3 酶的紫外吸收 纯化酶液在 200~400 nm 范围内扫描,其紫外最大吸收波长约 280 nm。据文献报道,Cu Zn-SOD 由于结构上的特殊性,其紫外区最大吸收在 256 nm 附近,Mn-SOD 和 Fe-SOD 由于含有较多的酪氨酸和色氨酸,因此其紫外吸收光谱类似一般蛋白质,在 280 nm 附近^[12]。而 H_2O_2 敏感性实验基本否定了 Fe-SOD 的可能性,说明该 SOD 为 Mn-SOD。

2.4 金属离子的影响

不同金属离子对 SOD 的影响见表 3。 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活产生微弱的抑制作用,而 Fe^{2+} 对酶活产生强烈的抑制。0.5 mmol/L 的 Mn^{2+} 对酶有少量激活作用,进一步验证了该酶为 Mn-SOD。 Fe^{2+} 的强烈抑制作用可能是因为体系中产生的 H_2O_2 与离子发生 Fenton 反应,产生一种比氧自由基毒性更强的羟自由基,从而攻击与金属离子配位的氨基酸残基,导致酶迅速失活^[14]。此外,随着离子强度的增高,使 SOD 的活力呈下降趋势,这可能是大量离子使得酶分子表面的电荷分布发生了变化,从而影响了酶与底物 $O_2^- \cdot$ 的接近所致。

表 3 金属离子对 *A. pascens* DMDC12 SOD 的影响

Tab. 3 Effect of metallic ions on SOD activity from strain DMDC12

金属离子	酶活力/%		
	离子浓度/(mmol/L)		
	0.5	1	10
Mg^{2+}	95	86	83
Ba^{2+}	95	84	83
Zn^{2+}	97	91	84
Cu^{2+}	92	89	62
Fe^{2+}	21	3	0
Mn^{2+}	107	96	88

2.5 酶的热稳定性和 pH 值稳定性

在各温度下处理后的 SOD 酶活见图 5。SOD 在 45 °C 下处理 40 min 时活力基本不变,在 60 °C 下酶失活较快,说明酶在 45 °C 以下显示出较好的稳定性。

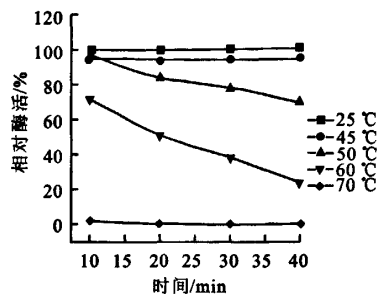


图 5 *A. pascens* DMDC12 SOD 的热稳定性

Fig. 5 Thermostability of SOD from strain DMDC12

所得 SOD 在 pH 5~9 范围内具有较好的稳定性,见图 6。酶活力基本不变,最适 pH 值为 8。据报道:超氧化物歧化酶的 pH 值稳定性与其含有的金属辅基有关。pH 值较低时(pH<4),酶分子中绝大部分的金属离子会从结合位点解离下来而导致失活。

3 结 语

从高度耐盐节杆菌(*A. pascens* DMDC12)中提取分离 SOD,粗酶液经硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sapharose FF 及 Source 15Q 离子交换层析,获得 SDS-PAGE 单一谱带的 SOD,其亚基相对分子质量为 23 300。纯化后酶比活力可达 2 183 U/mg,纯化

倍数为 53,回收率 51%,分离步骤简单,其回收率高于相关报道的 SOD 纯化工艺。

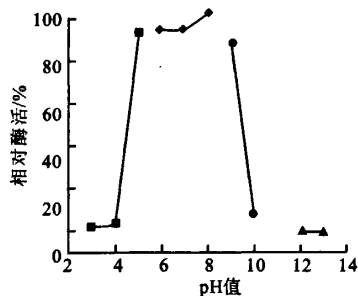


图 6 *A. pascens* DMDC12SOD 的 pH 值稳定性

Fig. 6 pH stability of SOD from strain DMDC12

对抑制剂的敏感性实验表明,酶对氯仿:乙醇敏感,对 H_2O_2 不敏感,且该酶在 280 nm 附近有最大吸收,因而判断本研究所纯化的超氧化物歧化酶为一种含锰的超氧化物歧化酶(Mn-SOD)。金属离子影响实验表明: Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 随离子浓度升高对酶产生抑制, Fe^{2+} 对酶抑制显著;0.5 mmol/L 的 Mn^{2+} 对酶有激活作用,进一步表明纯化后的 SOD 为 Mn-SOD,该 SOD 具有一定的热稳定性和 pH 值稳定性。

高度耐盐节杆菌中 Mn-SOD 的酶活显著受生长环境胁迫的影响^[6],证实了极端微生物与 Mn-SOD 的关系,可为开发、利用 Mn-SOD 提供新的微生物来源。该耐盐节杆菌的 Mn-SOD 的新基因克隆与表达正在进行中,以便进一步揭示该酶的结构与性质。

参考文献(References):

- [1] 袁勤生. 超氧化物歧化酶[J]. 国外医学分子生物学分册,1982,4(6):278-283.
YUAN Qin-sheng. Superoxide dismutase[J]. *Foreign Medical Science(Molecular Biology)*,1982, 4(6):278-283. (in Chinese)
- [2] 秦绪军. 新型肿瘤抑制因子含锰超氧化物歧化酶[J]. 国外医学肿瘤学分册,2001,28(3):170-173.
QIN Xu-jun. A novel cancer inhibitor contains manganese superoxide dismutase[J]. *Foreign Medical Science(Oncology Section)*,2001,28(3):170-173. (in Chinese)
- [3] 屠幼英. 从嗜热菌中提取 SOD 的研究[J]. 微生物学通报,1992,19(1):18-20.
TU You-ying. Separation of SOD from *Thermophilic bacteria* [J]. *Microbiology*, 1992,19(1):18-20. (in Chinese)
- [4] 高静. 疏棉状嗜热丝孢菌 *Thermomyces lannuginosus* 超氧化物歧化酶的分离纯化及性质研究[D]. 泰安:山东农业大学,2003.
- [5] 宋道军,李红,王纪,等. 氯离子注入对耐辐射异常球菌 SOD 活性的影响及其对 Mn-SOD 的诱导[J]. 微生物学报,1999,39(4):362-366.

- SONG Dao-jun, LI Hong, WANG Ji, et al. The effect of N^+ implantation on SOD activity of *Deinococcus Radiodurans* and induction of Mn-SOD[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(4): 362–366. (in Chinese)
- [6] 刘妮娜, 方民, 叶艳华, 等. 柠康酸培养体系对 *A. pascens* DMDC12r 的胁迫作用与其 SOD 活性和提高[J]. 南京师范大学学报(自然科学版), 2006, 29(4): 69–72.
- LIU Ni-na, FANG Min, YE Yan-hua, et al. Stress of media of citroconic acid on *A. pascens* DMDC12 and increase of its SOD activity[J]. *Journal of Nanjing Normal University*, 2006, 29(4): 69–72. (in Chinese)
- [7] Bing-Fang He, Toshiaki Nakajima-Kambe, Tetsuo Ozawa, et al. Production of D-malate and D-citramalate by *A. Pascens* DMDC12 having stable citraconase[J]. *Process Biochem*, 2000, 36: 407–414.
- [8] 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2): 163–165.
- DENG Bi-yu, YUAN Qin-sheng, LI Wen-jie. Improved method for determination of SOD activity by using pyrogallol[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1991, 18(2): 163–165. (in Chinese)
- [9] Bradford M. A rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein clye bineling[J]. *Anal Biochemistry*, 1976, 72: 248–255.
- [10] 蔡武城, 李碧羽, 李玉民. 生物化学实验技术教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1983, 1–58.
- [11] 朱文杰, 宋瑛. 东方弧菌 SOD 的分离纯化和特性研究[J]. 华东师范大学学报, 1995(1): 90–95.
- ZHU Wen-jie, SONG Ying. The purification and properties of superoxide dismutase from *vibrio orientalis* [J]. *Journal of East China Normal University*, 1995, (1): 90–95. (in Chinese)
- [12] Tauner J A, Getzoff E D, Richardsom J S. et al. Structure and mechanism of copper zinc superoxide dismutase[J]. *Nature*, 1983, 306: 284–287.
- [13] Baum J A, Scandalios J G. Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondriai superoxide dismutase of maize [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1981, 206: 249–254.
- [14] 罗广华, 王爱国, 付爱根. 定位染色法鉴定不同类型 SOD[J]. 生物化学与生物物理学进展, 1996, 23(4): 356–359.
- LUO Guang-hua, WANG Ai-guo, FU Ai-gen. The location staining method for distinguishing different types of SOD[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1996, 23(4): 356–359. (in Chinese)
- [15] 吴国荣, 邹玉珍. 猴头子实体锰型超氧化物歧化酶的纯化及性质鉴定[J]. 植物资源与环境, 1996, 5(2): 9–14.
- WU Guo-rong, ZOU Yu-zhen. Purification of Mn-superoxide dismutase from *Heridium erinaceus* and the identification of its properties[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 1996, 5(2): 9–14. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)