

球形芽孢杆菌 C3-41超氧化物歧化酶的特性

郑滔 刘娥英 蔡全信 袁志明 张用梅

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘 要 本文研究了球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*) C3-41超氧化物歧化酶(SOD)的产生条件和部分特性。当 C3-41菌株处于孢子囊中期时为产 SOD 酶高峰期,在 30℃ 下的平板培养物及培养基起始 pH 为中性(pH7.0)时产生的 SOD 酶比活最高,经硫酸铵分级沉淀,DEAE-32 离子交换层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤提纯了 SOD 酶。此酶属 Mn-SOD,在 25~35℃ 和 pH5~9 范围内较稳定,但在 55℃ 下 10min 完全失活。

关键词 球形芽孢杆菌,超氧化物歧化酶

分类号 Q939.124

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, 简称 SOD)是生物体防御氧化损伤的一种重要的酶,它可以催化超氧阴离子 O_2^- 的歧化反应并产生分子氧和过氧化氢,从而专一地清除 O_2^- 对细胞的毒害作用。SOD 在需氧的原核生物、真核生物体内广泛分布,现发现多种厌氧微生物体内也有存在^[1]。

国外对 SOD 进行了一系列的基础、应用研究和临床试验。但国内对其研究起步较晚,而且集中在真核细胞内的 Cu / Zn-SOD 的研究,对细菌内 SOD 研究较少^[2~4]。本文以球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus* 简称 B.s) C3-41 为材料,研究了此酶产生条件及其部分特性,将为利用此酶的保守性和同源性探索昆虫病原菌的分类鉴定新途径打下基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*) C3-41 由本实验室分离和保存。

1.2 缓冲液

0.1mol / L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH7.2 缓冲液,用于 SOD 酶的溶解和透析,并用含 0~0.2mol / L NaCl 的此缓冲液作洗脱液。

1.3 培养基

酵母膏 3g, 蛋白胨 10g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml, pH7.0~7.2。

1.4 SDS-PAGE

按参考文献[5]进行。

1.5 酶活性染色、酶活性测定、PAGE 和蛋白质测定

按常规方法进行^[6~8]。

1.6 SOD 酶的提取^[4]

按菌泥湿重:二氧化硅 = 1:5 的比例,于碾钵中冰浴碾磨破碎细胞,以菌泥湿重:缓冲液(含 0.01% 巯基乙醇) = 1:5 于 4℃ 下抽提 2h, 10,000r / min 离心 20min, 上清液为粗酶液。

1.7 酶的纯化

粗酶液加硫酸铵至 45%, 4℃ 处理 1h, 离心(10000r / min, 20min), 上清液再加硫酸铵至 80%, 重复上述操作, 沉淀溶于缓冲液中, 用同种缓冲液透析, 上 DEAE-32 柱, 用含 0~0.2mol / L NaCl 的 0.1mol / L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH7.2 的缓冲液洗脱(24ml / h), 收集活性峰, 浓缩, 上 Sephadex G-100 柱, 平衡, 洗脱, 收集

活性峰并浓缩。

2 结果与讨论

2.1 生长条件对 C3-41 SOD 产生的影响

2.1.1 C3-41 不同发育阶段对 SOD 酶活的影响: 为了了解 C3-41 菌株产生 SOD 酶的规律, 将此菌接种于平板上 30℃ 培养, 取不同发育阶段的菌苔测定其 SOD 比活, 结果表明 22h 孢子囊中期的菌苔, SOD 比活最高(表 1), 说明此发育阶段为产生 SOD 的最适期。此时为菌体积累物盛期, SOD 活性高对于清除 O_2^- 的损害作用和菌体的进一步发育十分有利。

表1 C3-41不同发育阶段SOD酶活比较

培养时间 (h)	发育阶段	酶活 (u/ml)	蛋白质浓度 (mg/ml)	比活 (u/mg)
14	营养体	209.2	21.0	9.96
18	孢子囊初期	164.6	18.0	9.14
22	孢子囊中期	194.6	14.5	13.42
26	孢子囊末期	182.6	17.9	10.17
48	芽孢期	68.6	9.3	7.36

2.1.2 生长温度对 C3-41 产 SOD 的影响: 将 C3-41 处于不同温度(25、30 和 35℃)培养时, 发现温度对其生长影响不明显, 而对其酶活尤其比活影响较大。结果表明, 30℃ 培养 22h 后, 其 SOD 比活最高, 达 14.6u / mg; 在 25℃ 下培养时, 比活最低(6.6u / mg); 35℃ 下居中, 比活为 12.9u / mg。

2.1.3 pH 对 C3-41 生物量及产 SOD 的影响: pH 对 C3-41 的生长及其 SOD 影响较大, 在 pH5.0 时, C3-41 根本不生长, 但 pH7.0 时, C3-41 的生物量最大, 而且其 SOD 酶比活最高, 达 12.5u / mg; 在 pH8.0 时, 比活为 9.0u / mg; 而在 pH6.0 和 pH9.0 时, 比活较低, 分别为 6.78 和 6.9u / mg。

2.2 SOD 的纯化

2.2.1 DEAE-32 离子交换柱层析: 经透析后的粗酶液直接上柱, 每次上样量为 5ml, 样品浓度平均为 14.8mg / ml。含 0~0.2mol / L NaCl 0.1mol / L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH7.2 的缓冲液洗脱, 流速为 24ml / h, 出现 4 个峰, 其中酶活峰在

峰 III 和峰 IV 之间(图 1)。

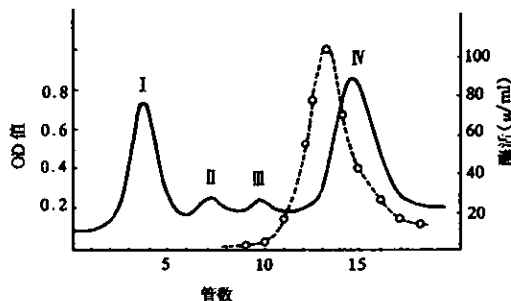


图1 粗酶的DEAE-32洗脱

2.2.2 Sephadex G-100 凝胶层析: 经 DEAE-32 离子交换所得到的酶活性部分经浓缩后, 上 Sephadex G-100 柱, 用缓冲液洗脱, 流速为 24ml / h, 每 10ml 收集一管, 出现三个洗脱峰, 活性峰为峰 III, 如图 2。经 PAGE 检测, 峰 III 为单一蛋白带, 证明 SOD 已纯化。

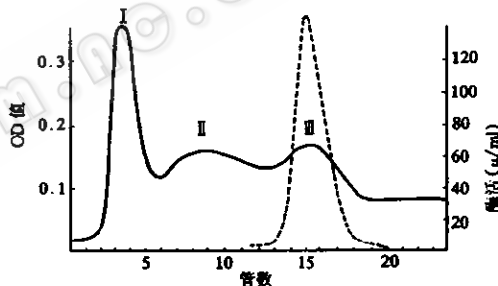


图2 Sephadex G-100分子筛洗脱

2.2.3 SOD 酶的纯化收得率: 50g 湿菌泥所得的粗酶经 DEAE-32, Sephadex G-100 等纯化步骤后, 可得 22.3mg 纯酶, 纯化 8.2 倍, 收得率为 6.1%(表 2)。

表2 球形芽孢杆菌C3-41 SOD酶的纯化

步骤	总体积 (ml)	总蛋白 (mg)	总酶活 (u)	比活 (u/mg)	收得率 (%)	纯化 倍数
粗酶	250	3000	30300	10.1	100	1
硫酸铵沉淀 (45~80%)	61.5	1200	24120	20.1	76.4	1.9
DEAE-32	18	120	6944	73.2	22.5	7.3
Sephadex G-100	5.0	22.5	1842.5	82.1	6.1	8.2

2.3 C3-41 SOD 的部分性质

2.3.1 C3-41 SOD 类型的判别: 不同类型 SOD 对 H_2O_2 和 KCN 的敏感性不同, Cu / Zn-SOD 对

两者都很敏感, Mn-SOD对两者都不敏感, 利用 H_2O_2 和 KCN 对所提取的酶进行抑制试验, 以 Cu / Zn-SOD 作对照, 发现所得的 SOD 对 H_2O_2 和 KCN 均不敏感, 对其酶活抑制率分别为 6% 和 1.7%, 而对 Cu / Zn-SOD 酶分别抑制 87.8% 和 100%; 而且当取纯酶 300ul 在 200~700nm 作扫描图时, 发现此酶的最大吸收峰为 275nm, 为 Mn-SOD 酶的特征吸收峰。由上述两方面的实验结果证明该酶为 Mn-SOD 酶。

2.3.2 温度对纯化 SOD 酶活的影响: 纯化酶在不同温度下处理不同时间, 测定其酶活, 证明在 25℃ 下该酶稳定, 在 35℃ 下处理 15min, 酶活下降 30%, 在 55℃ 处理 10min, 酶活完全丧失。

2.3.3 pH 对纯化的 SOD 酶活的影响: 经实验

可知, pH 对该酶酶活影响不明显, 在酸性条件下, 酶活稍高; 在 pH5.0~7.0 间, 酶活较稳定, 但 pH = 9.0 时, 酶活下降 26%。

参 考 文 献

- [1] 张博润, 谭华荣. 微生物学通报, 1992, 19(6): 352~357.
- [2] 谭天伟, 马润宁, 杨元忠. 微生物学报, 1997, 37(1): 68~71.
- [3] 邹国林, 罗时文, 裘名宜. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(2): 180~183.
- [4] 口如琴, 白玉明, 袁静明. 微生物学报, 1997, 37(2): 115~118.
- [5] Davis B J, Ann N Y. Acad Sci, 1964, 121: 404~427.
- [6] 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2): 163.
- [7] Bradford MM, Anal Biochem, 1976, 72: 248~254.
- [8] Misra H P, Fridovich I. Arch Biochem Biophys, 1977, 183: 511~515.

THE STUDY OF SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) PROPERTIES IN *BACILLUS SPHAERICUS* STRAINS C3-41

Zheng Tao Liu Eying Cai Quanxin Yuan Zhiming Zhang Yongmei

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

Abstract The production conditions and properties of Superoxide Dismutase (SOD) in *Bacillus sphaericus* strain C3-41 were reported in this paper. The experiment results showed that SOD production in B.s C3-41 began in the vegetative cells and reached a maximum at the middle phase of sporangia. It was also showed that 30℃ of growing temperature and pH7.0 of the primary growth medium were fit conditions for producing highest specific activity.

The SOD of C3-41 was purified by salting out with ammonium sulfate, column chromatograph on EDAE-32 and sephadex G-100. The enzyme was not inhibited by H_2O_2 or KCN. Therefore SOD of B.s C3-41 belongs to Mn-SOD. The enzyme was stable in the conditions of temperature range (25~35℃) and pH range (5.0~9.0), but lost its activity at 55℃ for 10 minutes.

Key words *Bacillus sphaericus*, Superoxide dismutase