

苏云金杆菌超氧化物歧化酶的纯化和性质研究*

蔡全信 刘娥英 张用梅 袁志明

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘要 苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 9165 超氧化物歧化酶 (SOD), 经硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤及非变性凝胶电泳 (PAGE) 三步纯化, 纯酶比活力为 438.8u/mg, 属 Mn-SOD, 分子量为 47.9ku, 由二个亚基组成, 含 19 种氨基酸。

关键词 超氧化物歧化酶, 苏云金杆菌, 纯化和性质

分类号 Q939.124 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-02-0110-12

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAIN

Cai Quanxin, Liu Eyin, Zhang Yongmei, Yuan Zhiming

(Wuhan Institute of Virology Academia Sinica, Wuhan 430071)

Abstract Superoxide dismutase from *Bacillus thuringiensis* 9165 was purified by a combination of ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 gel filtration and nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The purified enzyme was a highly homogeneous protein with the specific activity of 438.8u/mg. The results of study showed that the enzyme was a kind of Mn-SOD composed of two equally sized subunits, with a molecular weight of 47.9ku and it contained nineteen sorts of amino acids.

Key words Superoxide dismutase, *Bacillus thuringiensis*, purification and characterization

超氧化物歧化酶 (SOD) 是生物体内一种重要的 O_2^- 自由基清除剂, 可对抗生物分子氧化降解, 对机体起保护作用。有关 SOD 的报道很多^[1,2]。但至今尚未见到苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 中 SOD 的纯化和性质研究报道, 为此我们提纯了苏云金杆菌 9165 的 SOD, 并对其性质进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 苏云金杆菌 9165 由本室分离。

1.1.2 Sephadex G-100 为 Pharmacia 公司产品, 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺为 Sigma 公司产品, 过硫酸铵为 Bio-Lab 公司产品, Tris 为 Gibco 公

司产品, Glycine 为 BM 公司产品, TEMED 为 Shando Southern 公司产品, 分子量标准蛋白为上海 Promega 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: 菌种经 1% 蛋白胨、0.5% 酵母膏, pH7.5 的条件下, 30℃ 220r/min 活化 8h 后转接于 2% 琼脂的该培养基上, 30℃ 培养 20h, 收集菌体, 加入适量的石英砂研磨, 镜检细胞破碎率大于 95% 时, 加入适量的 TE (10mmol/L-Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0), 冰浴条件下

* 中国科学院区系分类特别支持项目

1998-03-16 收稿, 1998-05-21 修回

静置 10~30min, 12,000r/min, 4℃ 离心 10min, 上清即为粗酶液。

1.2.2 酶活力测定: 按邓碧玉方法^[9]。

1.2.3 蛋白质含量测定: 按 Bradford 方法^[4], 以牛血清清蛋白作标准。

1.2.4 分子量测定: 按 Leammli^[5]及参照 Gel filtration theory and practice^[6]。

1.2.5 紫外吸收光谱: 用岛津 UV-300 自动记录分光光度计扫描。

1.2.6 氨基酸组成测定: 用日立 835-50 型氨基酸分析仪测定。

1.2.7 酶类型鉴定: 按邹国林方法^[2]。

1.2.8 金属元素测定: 用日立 180/80 塞曼原子吸收光谱仪测定。

1.2.9 酶活性染色定位: 按 Misra 和 Fridovich 方法^[7]。

1.2.10 PAGE: 基本按 Davis 方法进行^[8]。

2 结果与讨论

2.1 SOD 纯化

2.1.1 硫酸铵沉淀: 粗酶液加硫酸铵至 30% 饱和度, 搅拌 10min, 15,000r/min, 4℃ 离心 20min 除沉淀, 上清再加硫酸铵至 80% 饱和度, 搅拌 10min, 15,000r/min, 4℃ 离心 20min, 沉淀溶于少许 TE 中, 然后对 TE 在 4℃ 搅拌透析, 离心除去不溶物。

2.1.2 Sephadex G-100 凝胶过滤: 透析上清液, 加到经 TE 平衡的 Sephadex G-100 柱上进行凝胶过滤层析, 收集酶活力峰 (图 1)。

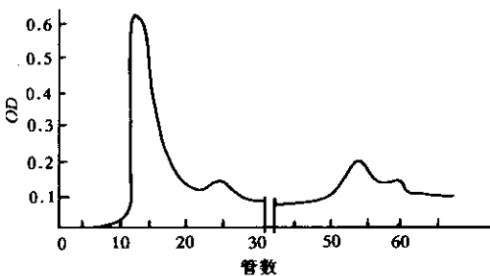


图1 SOD在Sephadex G-100凝胶过滤

2.1.3 PAGE: 浓缩后的酶活峰经 PAGE 纯化, 切取活性区带, 用电洗脱回收 SOD。

2.1.4 纯化结果: 经三步提纯, 酶比活力为 438.8u/mg, 纯化 42.85 倍, 活力回收为 5.8% (表 1)。SOD 的纯化最后步骤多采用柱层析法进行, 该步的活力回收在 18.7%~69.4% 之间^[1,2,9], 改用 PAGE 作为苏云金杆菌 SOD 的纯化, 其活力回收为 43.4%, 虽然此法可以确定地获得电泳纯样品, 但总回收较低, 有待进一步提高。

表1 苏云金杆菌9165 SOD的纯化

步骤	体积 (mL)	总蛋白 (mg)	总活力 (u)
Crude enzyme	90.0	180.79	1851.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	19.1	23.21	1080.4
Sephadex	24.0	1.01	245.9
G-100 PAGE	0.6	0.243	106.8
步骤	比活 (u/mg)	纯化倍数	活力回收 (%)
Crude enzyme	10.24	1.0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	46.55	4.5	58.3
Sephadex	243.56	23.7	13.3
G-100 PAGE	438.8	42.8	5.8

2.2 SOD 性质

2.2.1 纯度鉴定: 纯化 SOD 经 10%PAGE 检测, 结果见图 2。该酶经 PAGE 及 SDS-PAGE 均呈

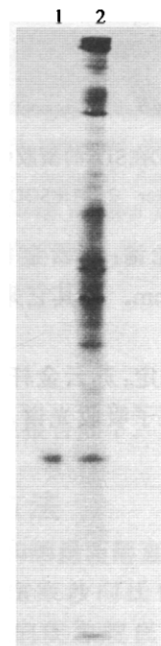


图2 SOD凝胶电泳

1.纯化SOD, 2.粗酶

现一条带,且PAGE活性染色与蛋白染色区带位置相对应,表明已达电泳纯。

2.2.2 酶分子量测定:用Sephadex G-100凝胶过滤法测得分子量介于Albumin egg(45ku)和BSA(66ku)分子量之间,用10%SDS-PAGE测得其分子量为23.95ku(图3),这与文献报道基本相同^[10],表明苏云金杆菌9165SOD由两个分子相同的亚基组成。

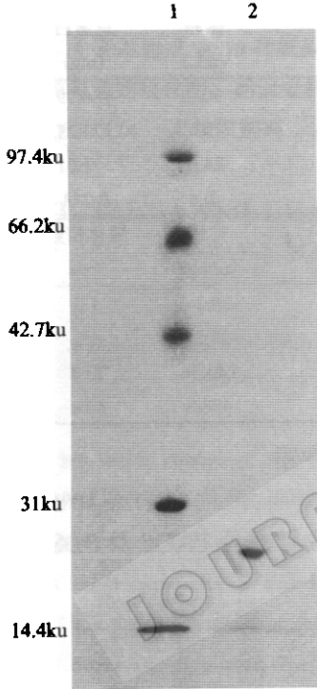


图3 SOD在SDS的凝胶电泳
1.Marker 2. 纯化SOD

2.2.3 紫外吸收光谱:苏云金杆菌9165 SOD最大吸收峰为280nm。与其它来源的Mn-SOD最大吸收相同^[1,2]。

2.2.4 金属元素测定:苏云金杆菌9165SOD有Mn-SOD的特征原子吸收光谱。结果证明该酶是Mn-SOD。

2.2.5 酶类型鉴定:1mmol/L KCN只抑制纯化酶的7.2%的活力;5mmol/L H₂O₂只抑制纯化酶的10.7%的活力。可见纯化的酶对KCN和H₂O₂均不敏感,表明该酶为Mn-SOD。与上述二法结果相一致。

2.2.6 氨基酸组成测定:见表2。苏云金杆菌9165 SOD的Gly含量高于其它来源的SOD的Gly含量^[2,10],是否与来源相关,尚待进一步研究。

表2 苏云金杆菌9165 SOD氨基酸组成

Ala	2.76	Arg	1.55	Asp	3.13	Cys	0.43
Glu	4.61	Gly	68.27	His	1.39	Ile	1.54
Leu	2.55	Lys	1.95	Met	0.20	NH ₂	1.76
Phe	1.62	Pro	1.03	Ser	1.14	Thr	1.58
Trp	3.16	Tyr	0.68	Val	2.38		

表中数字为氨基酸的%含量。

致谢 本所技术室和武汉大学测试中心和生物工程中心对本研究的支持和帮助。

参 考 文 献

- [1] 邹国林, 罗时文, 袁名宜等. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(2):180~183.
- [2] 口如琴, 白玉明, 袁静明等. 微生物学报, 1997, 37(2):115~118.
- [3] 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰等. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2):163.
- [4] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72:248~254.
- [5] Leammli U K. Nature, 1970, 227:680~685.
- [6] Gel filtration theory and practice, Pharmacia, Laboratory Separation Division.
- [7] Misra H P, Fridovich I. Arch Biochem Biophys, 1977, 183:511~515.
- [8] Davis B J. Ann N Y Acad Sci, 1964, 121:404~427.
- [9] 吕星, 方允中. 生物化学杂志, 1991, 7(4):496~500.
- [10] 张博润, 谭华荣. 微生物学通报, 1992, 19(6):352~357.