

从嗜热栖热菌中提取超氧化物歧化酶的研究

屠幼英

(中国农业科学院茶叶研究所, 杭州 310008)

倪福弟

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

陆应钰

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化技术公司, 上海 200233)

摘要 嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) ATCC 27634 是一种适于 75—80℃ 高温中生长的微生物。该菌超氧化物歧化酶为一胞内酶, 分子量为 80000, 由 181 个氨基酸组成。本试验对其发酵、破菌、RNaseI 酶解、硫酸铵盐析、滤除小分子物质、上 DE-32I、DE-32II 柱分离等条件进行了一系列研究, 提取到了热稳定性较高的 Mn^{++} -SOD, 比活力为 3000 u/mg, 回收率达 78.0%。

关键词 嗜热栖热菌 ATCC 27634; SOD; 提取

目前, 对主要来自哺乳动物超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 的研究已取得不少成果^[1-4], 但从微生物中提取 SOD 的研究报道不多, 尤其从嗜热栖热菌 ATCC 27634 中提取 SOD 国内尚无公开报道。本试验对从嗜热栖热菌中提取 SOD 的工艺进行了研究, 并且取得较理想的结果。

材料与方 法

(一) 材料

1. *Thermus thermophilus* ATCC 27634 的培养: 冷冻干燥的菌种(来自东京)置于液体培养基中, 在 75—80℃ 水浴恒温摇床(香港东南化学仪器公司)培养 16—20 小时, 然后转入高密度发酵罐 (SMS 英国 LAB line 仪器公司)中, 用空气泵通气培养, 并以 100r/min 的速度搅拌, 发酵 13—18 小时, 菌液在 3600r/min 下离心 60 分钟, 得到的菌体于冰箱中冷藏。该菌种的培养基配方: 蛋白胨 0.5%、酵母抽提液 0.3%、NaCl 0.2%、葡萄糖 0.1%。

2. 试剂: 黄嘌呤: 德国 Sigma 公司。黄嘌呤氧化酶: 自己制备 0.63u/mg。NBT: 上海

前进农场试剂厂。植物蛋白胨: 日本大五营养化学株式会社。SOD 标准样品: 上海生物化学研究所, 10 万 u/mg。

(二) 方法

1. SOD 的测定: 硝基四氮唑蓝还原法 (NBT)^[5]。

2. 蛋白测定: 蛋白浓度 (mg/ml) = 1.45 OD_{280nm} - 0.74 OD_{260nm}

3. 破菌方法: 采用超声波细菌破碎仪 (英国密斯仪器公司, 150W)。

4. SOD 的提取和纯化: 菌体用超声波破菌 → 3000r/min 离心除去菌体碎片 → 上清液用 DNaseI 酶解 → 用高速 18000r/min 离心除去核酸碎片 → 上清液用纸浆过滤 → 滤液上预平衡的 DE-32I 柱 (2.0 × 25cm), 用 0.2mol/L NaCl 缓冲液洗脱 → 活性部分用 45% 饱和度 $(NH_4)_2SO_4$ 盐析 → 离心收集酶蛋白, 用缓冲液溶解 → 超滤除去小分子物质 → 上 DE-32II 柱 (1.5 × 9.0cm), 用 0—0.2mol/L NaCl 缓冲液梯度洗脱, 得到分离的

本试验在东风试剂厂内完成。

SOD→冷冻干燥,备用。

所用缓冲液为 pH7.5 Tris 10mmol/L, EDTA 0.1mmol/L, 巯基乙醇 10mmol/L。

结果与讨论

(一) 培养基的选用

根据国外文献报道,对高温菌 ATCC 27634 的培养一般采用天然培养基,其成份为蛋白胨、酵母膏、NaCl、葡萄糖、用 NaOH 调节 pH 至 7.5。可以看出,此配方的价格较为昂贵,用于大规模发酵成本太高,因此,对合成培养基进行了研究。试验选用的合成培养基成份为生物素、蔗糖、NaCl 及适量的微量元素。结果表明,当用合成培养基和天然培养基在接种量一致的条件下发酵 11.5 小时,测得菌液的 OD_{650nm} 分别为 1.17 和 1.27,从而说明合成培养基对该菌株的作用与天然培养基基本一致。所以,大规模发酵生产时可用合成培养基代替天然培养基。

(二) 嗜热栖热菌的接种与生长

由于该菌株环境适应能力较弱,因此接种量较大。当接种后菌液初始浓度 OD_{650nm} 为 0.078 和 0.13 时,其最终菌体量后者为前者的一倍。当培养 5 小时后,菌株进入生长对数期,至 11 小时菌株分化速率减弱(图 1)。

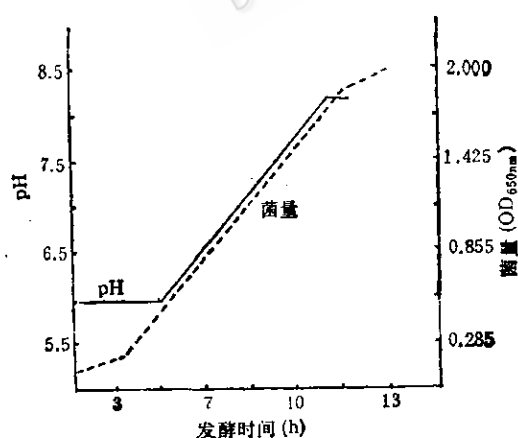


图 1 发酵期间菌液的浓度和 pH 变化曲线

发酵期间,随着菌体繁殖能力的变化发酵液 pH 也发生了迅速变化。如图 1 所见,对数期 pH 的变化呈线性向 pH 高的方向转变,而在滞延期和后期均无明显改变。

(三) SOD 经两次 DE-32 柱的分离效果

菌体 SOD 经两次 DE-32 柱层析分离后,杂蛋白基本除去。从图 2 可见,SOD 的酶活力峰在 6—16 管呈现最大活性部分,而在 16 管以后基本消除,从而说明,0.2mol/L NaCl 洗脱液可以把大部分的杂蛋白与酶蛋白相分离。

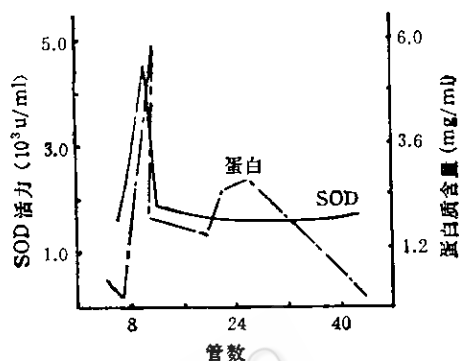


图 2 DE-32I 柱 SOD 的洗脱曲线

当酶液上第二根 DE-32 柱梯度分离时,又一次把杂蛋白与酶蛋白相分离,这在图 3 可以看到,16—26 管有一较大的杂蛋白峰,收集 26—32 管及 4—16 管的酶活性部分,使 SOD 得到进一步纯化。其中出现二个酶活力峰,可能它们是同功酶。

(四) 从嗜热栖热菌中提取 SOD 的纯化结果

经两次 DE-32 柱的分离纯化,SOD 的比

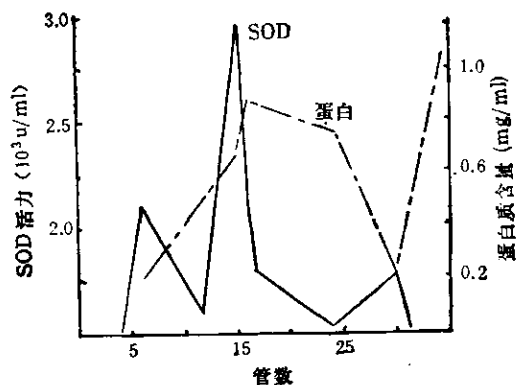


图 3 DE-32II 柱 SOD 的梯度分离曲线

活力有显著的提高(表 1),纯化的倍数为 6 倍左右。试验结果表明,采用本研究的分离纯化方法所得 SOD 比活力高,达 2606.9u/mg;活力回收高于文献报道的研究方法所得值(表 2)。

表1 从 ATCC 27634 中提取 SOD 各步纯化表

步 骤	总蛋白 (mg)	总 活 力 ($\times 10^3 u$)	比 活 力 (u/mg)	回收率(%)
上 DE-321 柱 原酶	705.0	3.2	446.7	100%
DE-321 柱 洗脱液	168.0	2.7	1607.1	84.4%
DE-32 II 柱				
洗脱液 第 I 部份	61.5	1.8	3000.0	
第 II 部份	34.4	0.69	2000.0	
汇 总	95.9	2.5	2606.9	78.1%

表2 不同来源 SOD 的活力回收

来 源	Smutans ^[1]	E. Coli B ^[2]	鸡肝线 粒体 ^[3]	牛血 ^[4]	鸡肝胞 液 ^[2]
回收率 (%)	27.0	12.0	40.1	71.9	12.7

可见,采用本方法进行大规模发酵提取 SOD 具有一定的可行性。

(五) 金属离子对该菌株 SOD 的影响

根据文献报道可知,微生物 SOD 的金属辅基一般为 Mn^{2+} ,而来自哺乳动物的 SOD 则以 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 为主。对该菌 SOD 的金属离子效应试验表明, Mn^{2+} 是其金属辅基,结果见表3。这与前人的研究相一致,因此保持一定浓度的 Mn^{2+} ,将对 SOD 活性的保存有帮助。

表3 不同金属离子对 SOD 活力的影响

金属离子	原酶活力 ($\times 10^3 u$)	处理后酶活力 ($\times 10^3 u$)	活力增加倍数
Mn^{2+}	5.52	10.9	2.0
Cu^{2+}	5.52	6.0	1.1
Zn^{2+}	5.52	7.2	1.3

(六) SOD 的热稳定性

因为 ATCC 27634 是一类适合在 75—80℃ 高温中繁殖的细菌,因此其胞内酶的热稳定性也较一般微生物要高,尤其 SOD 是一类抗逆环境中活性较高的酶。对该酶的一系列热稳定性试验表明,在 35℃ 保温 30 分钟,其酶活力为原酶的 50.0% 以上,在 48℃ 保温 15 分钟后,活力保存在 30.0% 以上。所以,在室温条件下使用该酶时活力损失较小,给生产和实际应用提供了很大的方便。

(七) 用微孔超滤法代替透析法

酶蛋白的沉淀采用 $(NH_4)_2SO_4$ 的盐析法,为了上柱分离酶蛋白,必须除去这些盐离子及其它小分子杂质,一般的试验条件下均采用缓冲液中反复透析的途径。本研究采用了微孔超滤法代替透析法,以克服透析时间长、酶易失活等弊端。结果表明,用透析法所得酶活力回收率只有 35.0%,而超滤法所得活力回收率为 73.0%。这可能有两个原因所致,一是超滤时间短,所以酶活力损失少;二是透析法除 $(NH_4)_2SO_4$ 时残留较高,而 $(NH_4)_2SO_4$ 对黄嘌呤氧化酶具有激活作用,即对 SOD 产生抑制作用,所以会在测定中造成一定误差,使透析法所得 SOD 活力回收偏低,用超滤法代替透析法除去小分子物质是方便可行的方法。

综上所述,从 *Thermus thermophilus* ATCC 27634 中提取 SOD 成本比从哺乳动物中提取成本要低,酶热稳定性高,采用本试验的途径所得 SOD 活力回收高,故发展从 ATCC 27634 中提取 SOD 是一条值得探索的途径。

参 考 文 献

1. Mccord J M et al.: *J. Biochem.*, 244(22): 6049—6055, 1969.
2. Beauchamp C et al.: *Anal. Biochem.*, 44(274), 1971.
3. Mccord J M et al.: *J. Biochem.*, 248(10): 3489—3592, 1973.
4. Larry W O: *Super oxide Dismutase*, CRC Press, U. S. A. 1(14—16), 1982.
5. Marklund S et al.: *Eur. J. Biochem.*, 47: 4679, 1974.
6. Petkau A et al.: *Biochem Biophys. Acta*, 71: 645, 1981.
7. Weser U and Schubotz: *Agents Actions Suppl.*, 8: 108, 1981.
8. 袁勤生等: *医药工业*, 14(1): 4, 1983.